

UNIVERSITE PARIS XIII – SORBONNE PARIS NORD

Ecole doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

THÈSE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR en Biologie, mention Biologie moléculaire et cellulaire

présentée et soutenue publiquement par

Gérôme BOHELAY

INSERM UMR 1125, Li2P, Physiopathologie, cibles et thérapies de la polyarthrite rhumatoïde

Le 08 Novembre 2022

Implication du couple CD83 membranaire / CD83 soluble dans le pemphigus auto-immun

Thèse soutenue devant le jury composé de :

M. Jean-David BOUAZIZ	PROFESSEUR DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER, UNIVERSITE DE PARIS	Rapporteur
M. Nicolas FAZILLEAU	DIRECTEUR DE RECHERCHE, INFINITY – INSTITUT TOULOUSAIN DES MALADIES INFECTIEUSES ET INFLAMMATOIRES	Rapporteur
MME Manuelle VIGUIER	PROFESSEUR DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER, UNIVERSITE DE REIMS-CHAMPAGNE-ARDENNE	Examinatrice
M. Frédéric CAUX	PROFESSEUR DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER, UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD	Examineur
M. Hugo MOUQUET	DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSTITUT PASTEUR	Examineur
M. Philippe MUNETTE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER, UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse de science vient conclure un parcours de double cursus universitaire entamé il y a plus de 18 ans. Au début de cette thèse le Pr Marie-Christophe Boissier, directeur de l'UMR INSERM 1125, m'avait dit que la thèse de science forge l'humilité ; ce que je ne peux que confirmer au bout de ces quatre dernières années. En effet, mener à bien une thèse requiert de la patience, de l'humilité face aux résultats, et de la persévérance dans les multiples formalités administratives ; tant de choses parfois difficiles à maintenir au cours du temps du fait des contraintes de travail à temps partiel, d'épidémie COVID et de financement.

Ainsi, ma première pensée va à toutes et tous les étudiants, de biologie et de médecine, qui malgré des difficultés de financement, d'encadrement, de moyens, et sans issue certaine de poste universitaire, continuent à faire fonctionner la recherche universitaire française par leurs efforts et leur investissement dans des conditions parfois difficiles.

Je remercie très chaleureusement Mr Jean-David Bouaziz, Mr Nicolas Fazilleau, Mme Manuelle Viguier, Mr Frédéric Caux et Mr Hugo Mouquet qui m'ont fait l'honneur de participer à mon jury de thèse afin d'évaluer mon travail. Je remercie particulièrement le Pr Bouaziz et le Dr Fazilleau pour leur rôle de rapporteur de ce jury. Je tiens aussi à chaleureusement remercier le Pr Frédéric Caux, qui fut mon chef de service pendant mon clinicat de dermatologie à l'hôpital Avicenne. Je vous remercie pour tout ce que j'ai appris à votre contact pendant mon internat et mon clinicat, ainsi que pour le soutien constant que vous m'avez manifesté au cours de ces 8 dernières années.

De même, je remercie vivement le Pr Thorsten Braun, qui fut mon tuteur au cours de cette thèse, pour son écoute, ses conseils précieux et son soutien lors des moments difficiles de ces dernières années. Sans ce comité de suivi pour m'épauler au cours de ces dernières années, il est probable que ma thèse n'aurait pas aboutie.

Je remercie vivement mon directeur de thèse, le Pr Philippe Musette, pour m'avoir accepté comme étudiant et m'avoir accordé sa confiance pour mener ce projet de recherche. A votre contact, j'ai appris à travailler de manière indépendante et à collaborer avec d'autres équipes de recherche. Je vous remercie pour votre soutien, notamment lorsque nous avons dû modifier notre axe de recherche en fin de première année de thèse, mais aussi pour votre compréhension d'impératifs financiers et familiaux impactés par les aléas des restrictions liés au COVID.

Je tiens à adresser ma sincère reconnaissance au Pr Marie-Christophe Boissier, directeur de l'UMR INSERM 1125 Li2P pour son accueil pendant 4 ans au sein de son équipe, pour sa bienveillance et ses conseils. Merci beaucoup pour votre grande disponibilité et votre gentillesse à mon égard.

Je remercie l'ensemble des membres du Li2P qui m'ont permis d'avancer dans cette thèse en participant à ma formation grâce à leurs conseils. Ainsi, je remercie le Pr Natacha Bessis pour ses conseils pragmatiques à mes nombreuses questions concernant la soutenance et l'écriture de thèse. Je tenais aussi à vous remercier, ainsi que le directeur de l'école doctorale, le Pr Olivier Bodini, pour votre écoute et vos conseils lorsqu'ils se sont avérés nécessaires suite aux difficultés relationnelles rencontrés dans le laboratoire. Merci beaucoup au Dr Eric Assier et au Dr Jérôme Biton pour leur bonne humeur et leurs conseils ; spécialement Jérôme pour avoir répondu à mes multiples questionnements sur la cytométrie de flux et pour son aide à la réalisation de matrices de corrélations.

Merci aux ingénieures du laboratoire, Delphine, Roxanne et Magali pour leur rigueur, leur bonne humeur et pour avoir participé à ma formation ; votre investissement dans le laboratoire contribue grandement et efficacement à son fonctionnement. Cependant, nos séances de nettoyage des pièces 13 et 16 ne me manqueront pas particulièrement.

Je tiens à remercier chaleureusement les personnes ayant permis mon accueil au sein du laboratoire INSERM 976 et ainsi de débiter le projet sur l'étude du CD83 dans le pemphigus. Je tiens à signifier ma profonde reconnaissance au Dr Armand Bensussan qui m'a accueilli au sein de l'UMR 976 et au Dr Anne Marie Cardine qui m'a permis d'intégrer son équipe pour la réalisation des expériences d'allostimulation. Merci aux ingénieurs du laboratoire INSERM 976 qui m'ont permis d'être fonctionnel sur le site et au Dr Véronique Parietti-Montcuquet de m'avoir formé à l'utilisation de l'irradiateur de la plateforme de l'Institut de Recherche Saint-Louis.

Je tiens à remercier le Dr Baptiste Janela, responsable du Skin Research Institute of Singapore. Les difficultés administratives et la pandémie de COVID-19 ne m'auront finalement pas permis de réaliser l'année de mobilité prévue au Singapour Immunology Network en 2020. Cependant, la collaboration entre nos équipes de recherche a permis d'aboutir à des résultats d'intérêt dans le pemphigus. Votre collaboration étant amenée à se poursuivre avec le Pr Musette sur d'autres projets déjà lancés, j'espère qu'elle sera fructueuse.

Je remercie chaleureusement l'équipe de dermatologie de l'hôpital Avicenne pour leur soutien et sans qui ce projet n'aurait pu avoir lieu. Merci à Benoit Meellotte et à Mylène Petit qui ont participé au protocole de recherche en tant qu'ARC. Merci au Dr Marina Alexandre, au Dr Christelle Le Roux-Villet et au Pr Catherine Prost-Squarcioni qui suivent les patients du centre, pour leurs inclusions dans le protocole et pour leur soutien. Je tiens aussi à remercier la direction, les chargés de projet, ainsi que les ARC de l'URC pour l'aide à l'écriture du projet de recherche interventionnelle. Sans votre aide, il aurait été impossible d'effectuer ce travail de recherche fondamentale dans le cadre éthique réglementaire français. J'en profite pour remercier le Dr Florence Morin et le Pr Antoine Martin pour leur participation à ce travail.

Je tiens à remercier les commissions des bourses du Collège des Enseignants en Dermatologie de France et de la Société Française de Dermatologie d'avoir participé au financement de cette thèse.

D'autre part, je tiens à remercier les doctorants et les étudiants en master avec qui j'ai partagé ces quatre années, d'abord dans le même bureau puis de manière plus distante. Merci à Elies, Dyhia, Maxime, Lyna et Mégane pour leur bonne humeur et leur soutien. Eliès, tu resteras pour moi un exemple de persévérance, de calme, passionné par la science ; ta bonne humeur m'aura manqué au cours de deux dernières années. Mégane, merci pour ta bonne humeur qui a égaillé mes dernières années de thèse. Je vous souhaite à tous d'obtenir des postes à la hauteur de votre investissement.

Par ailleurs, je remercie l'ensemble des chercheurs et étudiants des autres unités du bâtiment INSERM pour leur conseils et leur aide ; notamment Mr Ledoux, Mme Varin-Blank, Mme Besnard, Mme Dondi, Mme Aubard et Mr Oudar.

Pour finir ces longs remerciements, je tiens à remercier du plus profond du cœur mes parents et ma famille ; une famille qui m'a inculqué ses valeurs de persévérance et d'investissement dans le travail. Merci à mes parents et à mon frère de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ces années d'études. Enfin, merci à ma femme, Marie Laure, et à mon fils, Gabriel, pour leur soutien et leur amour quotidien qui m'ont permis de relativiser et d'accepter les contre-temps, les vexations, les échecs et les difficultés multiples rencontrées au cours de ces quatre dernières années. Cette thèse m'a rappelé que le plus important est quand même de trouver un sens à son travail, d'avoir un environnement professionnel adapté et une rétribution adaptée à son investissement permettant d'assurer le bien-être de sa famille.

Je dédie cette thèse à toutes les personnes qui m'ont formé au cours des dernières années et qui ont participé à ma formation de médecin et chercheur.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	iii
SOMMAIRE	vii
LISTE DES ABBREVIATIONS	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
INTRODUCTION	15
A. LES EPITHELIUMS MALPIGHIIEN KERATINISES, ORGANE CIBLE DES MALADIES BULLEUSES AUTO-IMMUNES	15
1. La peau : organisation structurelle	15
2. L'épiderme	16
3. Système d'adhésion kératinocytaire cibles des auto-anticorps des MBAI	18
a. Adhésion kératinocytes-jonction dermo-épidermique	18
b. Adhésion inter-kératinocytaire	20
4. Les niveaux fonctionnels de la barrière cutanée	23
B. IMMUNITE ADAPTATIVE	27
1. Acteurs de l'immunité adaptative	27
2. TCR et BCR	28
3. Lymphocytes T	29
4. Lymphocytes B	29
a. Les sous-populations lymphocytaires B	29
b. Les Anticorps	33
5. Mécanismes permettant la tolérance immunologique	36
a. Tolérance immunitaire T	37
Tolérance T centrale	37
Tolérance T périphérique	38
b. Tolérance immunitaire B	39
Tolérance B centrale	39
Tolérance B périphérique	39
c. Rupture de tolérance	40
C. LES DIFFERENTES MALADIES BULLEUSES AUTO-IMMUNES	41
D. LE GROUPE DES PEMPHIGUS	47
1. Manifestations cliniques et critères diagnostiques des variants de pemphigus	47
a. Pemphigus vulgaire	47
b. Pemphigus superficiel	49
c. Pemphigus paranéoplasique	51
d. Autres formes de pemphigus	52

2. Facteurs de risque associés au pemphigus	54
a. Facteurs de risque génétiques.....	54
b. Facteurs de risque environnementaux	55
c. Traitements inducteurs.....	55
3. Mécanismes immunologiques impliqués dans le pemphigus.....	56
a. Auto-anticorps	56
b. Lymphocytes B – Lymphocytes T	61
c. Cellules myéloïdes.....	63
d. Infiltrat immunitaire dermique dans le pemphigus	64
• Structures ectopiques lymphocytaires.....	65
• Cellules immunitaires présentes dans la peau/muqueuse lésée de patients ayant un pemphigus.....	66
4. Thérapeutique du Pemphigus	68
a. Outils d'évaluation clinique.....	68
b. Traitements immunosuppresseurs conventionnels/Immunomodulateurs	68
c. Rituximab et pemphigus.....	69
d. Thérapeutiques immunomodulatrices	74
e. Nouvelles approches thérapeutiques	75
• Traitements locaux	75
• Thérapeutiques visant à dépléter les LB	75
• Thérapeutiques visant à dépléter les auto-anticorps.....	76
• Thérapeutique visant à dépléter les LB autoréactifs.....	77
5. Objectifs de la recherche dans le pemphigus	78
E. CD83	79
1. Généralités	79
2. CD83 membranaire.....	80
a. CD83m et DC	80
b. CD83m et lymphocytes T.....	81
c. CD83 membranaire et lymphocytes B.....	82
3. Partenaires de CD83	85
4. CD83 soluble	86
5. CD83 et maladies auto-immunes/inflammatoires	86
OBJECTIFS.....	90
MATERIEL ET METHODES	91
Echantillons humains.....	91
Isolement des PBMC et des lymphocytes B circulants	92
Spectrométrie de masse, RNAseq et scRNAseq	92
Cultures cellulaires in vitro de PBMC.....	94

Cytométrie de Flux.....	94
ELISAs	95
Analyses histologiques et immunohistochimiques sur prélèvement tissulaire.....	96
Co-immunofluorescence sur prélèvement tissulaire	97
Analyses statistiques	97
RESULTATS	99
Identification de différentes sous-populations de lymphocytes B par spectrométrie de masse chez les patients ayant un pemphigus actif ou en rémission et chez les donneurs sains.....	99
Différences transcriptomiques entre lymphocytes B de patients ayant un pemphigus et de donneurs sains.....	101
Différences transcriptomiques des LB Dsg3+ et Dsg3- des patients ayant un pemphigus actif, et en rémission et de donneurs sains.....	104
CD83m est surexprimé par les lymphocytes B de patients ayant un pemphigus actif en comparaison aux donneurs sains.....	106
En zone lésée de pemphigus vulgaire et superficiel, la derme et le chorion contiennent des structures ectopiques lymphocytaires comprenant des LB exprimant CD83m	108
Le CD83 soluble sérique est abaissé chez les patients pemphigus et est corrélé positivement aux taux d'anticorps anti-Dsg3	113
Les PBMC de patients ayant un pemphigus actif en culture ont une production augmentée d'Ig totales et d'anticorps anti-Dsg lors de l'ajout d'anticorps anti-CD83.....	115
DISCUSSION.....	119
Etude phénotypique et transcriptomique des LB de patients ayant un pemphigus actif, en rémission et de donneurs sains.....	119
Expression de CD83m par les LB circulants et infiltrant les tissus lésés de patients ayant un pemphigus	122
Expression de CD83m et de CD83s en culture	125
CD83s sérique dans le pemphigus.....	127
Conclusions et perspectives	130
Supplementary Data.....	133
Annexes.....	143
Annexe I	144
Annexe II	171
Annexe III	191
Annexe IV	199
Annexe V	216
Annexe VI	230
Références.....	231
Résumé Français.....	Erreur ! Signet non défini.
Résumé Anglais	Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

A2ML-1 : α -2 macroglobuline-like 1
AChR : récepteur α à l'acétylcholine
ADCC : cytotoxicité dépendante des anticorps
ADCP : phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand

B

BAFF: B-cell Activation Factor
BCR : B cell receptor
BP180 : Bullous pemphigoid antigen 180 kDa
BP230, Bullous Pemphigoid antigen 230 kDa
BTK: tyrosine kinase de Bruton
BTKi: inhibiteur de tyrosine kinase de Bruton

C

CAR : Chimeric Antigen Receptor
CAAR : Chimeric Autoantibody Receptor
CD : cluster de différenciation
CDC : cytotoxicité dépendante du complément
CLR : C-type lectin receptor
CPA : cellules présentatrices d'antigène

D

DAMPs: Danger Associated Molecular Pattern
DC : cellules dendritiques
DPK, desmoplakine
Dsc : desmocolline
Dsg : desmoglénine

E

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPK, épiplakine
EVPK, envoplakine

F

FAA: free fatty acids
FDCs : cellules dendritiques folliculaires
FRCs : cellules réticulaires folliculaires

H

HACA: anticorps anti-chimère humains
HEVs :High endothelial veinules

I

ICOS: inducible costimulator
IDP : plaque dense interne (inner dense plaque)
IFD : immunofluorescence directe
Ig : Immunoglobulines
IgIV : Immunoglobulines intra-veineuses
IFN : interféron
IL : interleukine
ILC: innate lymphoid cell
iNKT: invariant natural killer cell

J

JCE : jonction chorio-épithéliale
JDE : jonction dermo-épidermique

L

LB : lymphocyte B
LCs : cellules de Langerhans
LES : lupus érythémateux systémique
LT : lymphocyte T

M

mAbs : anticorps monoclonaux
MBAI : maladie bulleuse auto-immune
MDSCs : cellules myéloïdes suppressives
MMP : pemphigoïde des muqueuses

N

NK: natural killer
NLR: Nucleotid-binding Oligomerization Domain-like Receptors

O

ODP : plaque dense externe (outer dense plaque)

P

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC: cellules mononuclées du sang périphérique
PC: cellules plasmatiques
PD-1: programmed death 1
PG: plakoglobine

PK: plakophiline

PPK, périplakine.

PS : pemphigus superficiel

PPN : pemphigus paranéoplasique

pTreg : Lymphocytes T régulateurs
périphériques

PRR : Pathogen Recognition Pattern

PR : polyarthrite rhumatoïde

PV : pemphigus vulgaire

R

RLR: RIG-I like receptors

RNA-seq: RNA sequencing

RT-qPCR : reverse transcriptase qualitative
polymerase chain reaction

S

Sc-RNA-seq : single cell RNA sequencing

SNP : polymorphismes nucléotidiques simples

T

TCR : T cell receptor

TECs : cellules épithéliales thymiques

Teff : lymphocytes T effecteurs

Tfh : lymphocytes T auxiliaires folliculaires

Th: lymphocytes T auxiliaires

TGF: Transforming Growth Factor

TLR : Toll-like receptor

TLS: structures lymphoïdes tertiaires

TNF : Tumor Necrosis Factor

Tph : Lymphocyte T périphérique auxiliaire

Trm : Lymphocyte T résident mémoire

tTreg: Lymphocytes T régulateurs thymiques

U

UV : ultraviolet

RLR: RIG-I like receptors

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

- Figure 1.** Organisation structurale des couche de la peau.
- Figure 2.** Epithéliums malpighiens
- Figure 3.** Systèmes de jonction cibles d'auto-anticorps dans les MBAI (hémidesmosomes et jonction dermo-épidermique)
- Figure 4.** Examen en microscopie électronique montrant un desmosome de peau humaine saine avec représentation schématique de la structure d'un desmosome
- Figure 5.** Représentation schématique de la distribution des protéines desmosomales dans les différents couches de l'épiderme et des muqueuses
- Figure 6.** Représentation schématique des interaction *cis* et *trans* des cadhérines desmosomales
- Figure 7.** Couches et composants de la barrière cutanée
- Figure 8.** Acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative dans la peau
- Figure 9.** Ontogénèse des lymphocytes B humains
- Figure 10.** Représentation schématique des interaction des IgG avec les molécules effectrices se liant au fragment Fc par lesquelles les anticorps exercent leur activité biologique
- Figure 11.** Représentation schématique de la tolérance centrale des lymphocytes T
- Figure 12.** Tolérance centrale des lymphocytes B
- Figure 13.** Les différentes maladies bulleuses auto-immunes
- Figure 14.** Antigènes cibles, présentation clinique cutanée et muqueuse, zone de clivage en histologie et dépôt d'auto-anticorps des principales maladies bulleuses auto-immunes
- Figure 15.** Manifestations cliniques du pemphigus vulgaire
- Figure 16.** Manifestations cliniques du pemphigus superficiel
- Figure 17.** Manifestations cliniques des autres variants de pemphigus
- Figure 18.** Représentation schématique de la desmogléine
- Figure 19.** Représentation schématique de rôle des anticorps du pemphigus dans l'acantholyse
- Figure 20.** Structure lymphocytaire tertiaire péri-tumoraux dans le carcinome épidermoïde du poumon
- Figure 21.** Modélisation de la structure de CD83 sous forme homotrimérique à la surface membranaire et sous forme monomérique soluble
- Figure 22.** Représentation schématique du mode d'action de CD83s

RESULTATS

- Figure 23.** Résultats de l'analyse de l'expression d'un panel de 37 marqueurs par les lymphocytes B de patients ayant un pemphigus actif (J0), en rémission (M36) et de donneurs sains (HD) en spectrométrie de masse.
- Figure 24.** Résultats de l'analyse par RNA-seq des lymphocytes B de patients ayant un pemphigus et de donneurs sains.
- Figure 25.** Résultats de l'analyse par single cell RNA-seq des lymphocytes B CD19+ Dsg3+ de patients et de donneurs sains.
- Figure 26.** Etude par FACS de l'expression de CD83m par les LB de patients ayant un pemphigus actif ou en rémission et de donneurs sains.
- Figure 27.** Analyses des infiltrats lymphocytaires de la cohorte de biopsies de pemphigus.
- Figure 28.** Composition des infiltrats lymphocytaires des zones lésées de pemphigus.
- Figure 29.** Co-immunofluorescence de CD19 et de CD83 au sein du derme en peau lésée de pemphigus.
- Figure 30.** Etude du CD83 soluble sérique chez les patients ayant un pemphigus.

Figure 31. Effet d'anticorps anti CD83 polyclonal sur l'expression des marqueurs d'activation et la production d'immunoglobulines par les LB en culture de PBMC allostimulées.

Figure 32. Effet d'anticorps anti CD83 polyclonal sur l'expression des marqueurs d'activation et la production d'immunoglobulines par les LB en culture de PBMC de patient pemphigus sans allostimulation.

DONNEES SUPPLEMENTAIRES

Supp Data 1 : Résultats de l'analyse par RNA-seq comparant les transcriptomes des sous-populations de lymphocytes B de patients ayant un pemphigus et de donneurs sains appariés phénotypiquement.

Supp Data 2 : Résultats de l'analyse par single cell RNA-seq comparant les transcriptomes de lymphocytes B Dsg3+ et Dsg3- de donneurs sains et de patient ayant un pemphigus au stade actif et au stade de rémission.

Supp Data 3 : Stratégie de fenêtrage de l'analyse par FACS des PBMC de patients et de donneurs sains.

Supp Data 4 : flow chart d'identification et des patients inclus pour l'analyse histologique et pour le dosage sérique du CD83 soluble.

Supp Data 6 : Exemples des infiltrats du derme et du chorion mis en évidence en peau lésée dans le pemphigus.

Supp Data 7 : Proportions des infiltrats présentant un renforcement périvasculaire, annexiel, un aspect nodulaire ou un aspect de grenz zone en fonction du type de pemphigus et du site biopsié.

Supp Data 8 : Méthodes de mesure des densité d'infiltrat en HES et des surface marquée en immunohistochimie réalisée avec le logiciel Histolab®.

Supp Data 9 : A. Comparaison des surfaces marquées par le CD3, le CD20, le CD138, le CD83 sur les biopsies de PV et de PS, et sur les biopsies cutanées et de muqueuses. B. Corrélation (Pearson) entre les surfaces marquées par le CD83 et par le CD3, le CD20 et le CD21.

Supp Data 10 : Co-immunofluorescence de CD19 et de CD83 au sein du derme en peau lésée de pemphigus.

Supp Data 11 : Stratégie de fenêtrage de l'analyse par FACS des PBMC de patients à J6 de culture.

Supp Data 12 : Cinétiques d'expressions des marqueurs d'activation (CD83, CD69, CD86) par les lymphocytes B.

Supp Data 13 : Taux d'IgG et d'IgM totales des conditions contrôles des expériences d'allostimulation de PBMC.

Supp Data 14 : Résultats de l'application d'anticorps anti CD83 polyclonal sur l'expression des marqueurs d'activation et la production d'immunoglobulines par les LB en culture de PBMC sans allostimulation

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1. Fonction des intervenants majeurs du système immunitaire cutané à l'état normal et pendant la réparation tissulaire.

Tableau 2. Principaux marqueurs des LB transitionnels et matures hormis LB régulateurs, PC régulatrices et cellules B1.

Tableau 3. Isotypes et sous classes d'immunoglobulines.

Tableau 4. Principales manifestations cliniques et auto-anticorps associé au MBAI sous-épidermiques

Tableau 5. Applications thérapeutiques en cours de développement ciblant CD83m et/ou utilisant CD83s.

DONNEES SUPPLEMENTAIRES

Supp Data 5: Données cliniques des patients ayant un pemphigus inclus pour les analyses histologiques, immunohistochimiques, et du CD83 soluble sérique.

INTRODUCTION

A. LES EPITHELIUMS MALPIGHIEN KERATINISES, ORGANE CIBLE DES MALADIES BULLEUSES AUTO-IMMUNES

Les maladies bulleuses auto-immunes (MBAI) sont un groupe de maladies hétérogènes où la rupture de tolérance immunitaire est à l'origine de l'apparition d'auto-anticorps pathogènes ciblant des constituants protéiques variés des systèmes jonctions inter-kératinocytaires (kératinocytes-kératinocytes) ou de la jonction dermo-épidermique/chorio-épithéliale (kératinocytes-matrice extracellulaire) des épithéliums malpighiens (1). La disruption de ces systèmes de jonction est à l'origine des manifestations cliniques communes aux différentes MBAI, bulles et érosions de la peau et/ou des muqueuses qui permettent ainsi de suspecter le diagnostic de MBAI. Leur aspect, leur répartition et leur évolution diffèrent en fonction du type de maladie, ce qui a abouti au cours du siècle dernier à une classification nosologique basée sur leurs présentations cliniques. L'évolution des connaissances en immunologie au cours des quarante dernières années a permis de mieux caractériser les antigènes cibles des auto-anticorps dans les MBAI, ce qui a permis de mieux comprendre les différences cliniques observées et qui a abouti à l'apparition de nouvelles entités nosologiques en lien avec le ou les antigènes ciblés et au regroupement de certaines entités cliniquement proches mais dont la cible antigénique diffère (2–4).

1. La peau : organisation structurelle

La peau et les muqueuses représentent une barrière essentielle contre les agressions physiques, chimiques, et infectieuses provenant de l'environnement, tout en assurant les échanges avec ce dernier. Ils contiennent des structures mécaniques et un réseau dynamique de cellules immunitaires participant à l'homéostasie de l'organisme. La peau est un des plus grands organes de l'être humain, mesurant environ 2 m² chez l'adulte (5). Cet organe est constitué de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Fig. 1**). L'épiderme est séparé du derme par la jonction dermo-épidermique. Le derme et l'hypoderme sont des tissus conjonctifs sous-cutanés, dense et fibreux pour le premier, lâche et contenant des adipocytes pour le deuxième. Ces couches sous-épidermiques permettent le maintien physique de l'épiderme par leurs fonctions de soutien et les apports nutritionnels et immunitaires par la présence de vaisseaux sanguins.

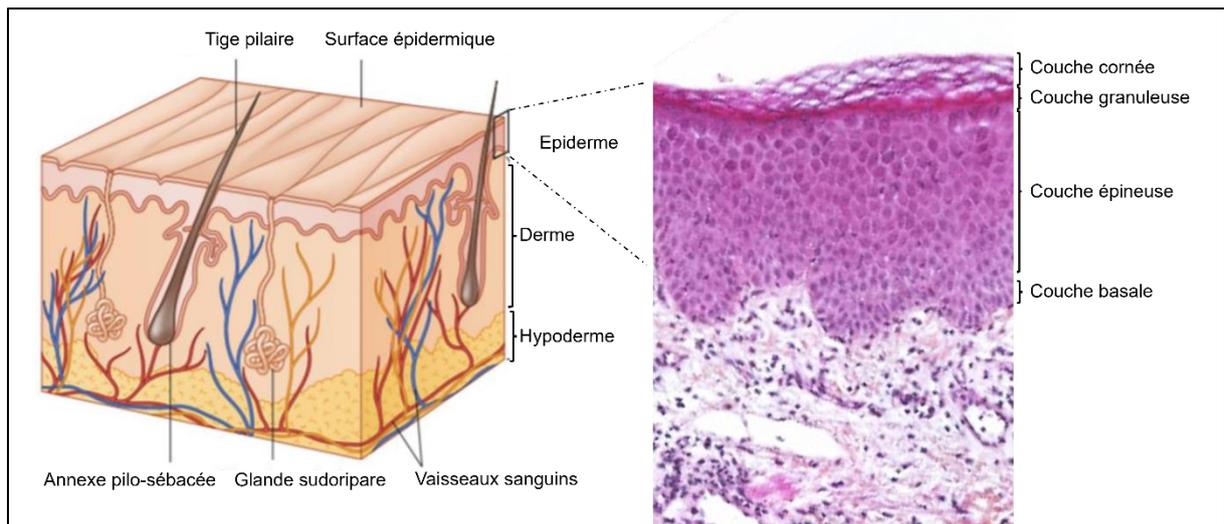


Figure 1. Organisation structurelle des couche de la peau.

A gauche, schéma des différentes couches de la peau ; de la profondeur vers la superficie : hypoderme, derme et épiderme (adapté de Someya et al, Nat biotechnol 2019 [6]). A droite, examen histologique d'une biopsie cutanée colorée par l'hématoxyline, éosine et safran (grossissement x100) montrant les différentes couche de l'épiderme ; de la profondeur vers la superficie : couche basale, couche épineuse, couche granuleuse, couche cornée.

2. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium malpighien, stratifié, squameux et kératinisé recouvert de sébum hydrolipidique produit par les glandes sébacées. L'épiderme est constitué de quatre types cellulaires.

Les kératinocytes représentent 90% des cellules épidermiques et permettent par leur cohésion intercellulaire de former une barrière protégeant l'organisme des agressions extérieures. Ces kératinocytes s'organisent en quatre couches distinctes correspondant à différents stades de différenciation cellulaire (**Fig. 1**). La couche la plus profonde est la couche basale, riche en cellules souches qui vont donner naissance aux nouveaux kératinocytes (5). Au cours de leur migration de la couche basale vers la couche cornée, les kératinocytes perdent leur potentiel de prolifération et vont synthétiser des kératines, formant le cytosquelette intracellulaire, qui s'associent aux microfilaments d'actines et aux microtubules. Les kératinocytes vont renforcer leur système de cohésion inter-kératinocytaire grâce à la présence de nombreux desmosomes dont la partie intracellulaire s'associe au cytosquelette intracellulaire. Ces modifications structurales permettent de distinguer les couches épineuses et les couches granuleuses (**Fig. 1**). La couche la plus superficielle de l'épiderme correspond à la couche cornée où les kératinocytes ont perdu leurs noyaux et où leurs membranes sont remplacées par une enveloppe cornée; les kératinocytes, ici appelés cornéocytes, sont alors réunis par des cornéodesmosomes dont la dégradation progressive est à l'origine de la perte continue des couches les plus superficielles donnant lieu au phénomène physiologique de desquamation.

Les trois autres types cellulaires présents dans l'épiderme sont les mélanocytes, les cellules de Langerhans (LCs) et les cellules de Merkel. Les mélanocytes, présents dans la couche basale de l'épiderme et dans les follicules pileux, ont pour fonction principale de produire des mélanosomes contenant les mélanines, permettant de protéger la peau des dommages induits par rayonnements ultraviolets (7). Ces mélanosomes sont transférés aux kératinocytes et sont responsables de la coloration de la peau et des cheveux (8,9). Les mélanocytes participent par ailleurs à de nombreux systèmes de régulation en tant que récepteurs de stress cellulaire et par leur production de neurotransmetteurs et de divers facteurs de croissance (10). Les LCs sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) uniquement présentes dans l'épiderme bien que des cellules aux fonctions similaires aient été mises en évidence dans d'autres épithéliums tels que la muqueuse buccale (11). Ces LCs captent les antigènes avant de les apprêter et de les présenter aux lymphocytes dans les ganglions lymphatiques; en fonction de la présence ou non de signaux de dangers, les LCs vont participer à la tolérance immunitaire ou activer les lymphocytes T (LT) du système immunitaire adaptatif pour induire une réponse effectrice efficiente (12). Les cellules de Merkel sont des cellules mécano-réceptrices présentes dans l'épiderme interagissant avec les fibres nerveuses afférentes responsables de la sensation du tact superficiel (13).

Les MBI peuvent atteindre la peau et les muqueuses qui se différencient par leur épithélium; épithélium malpighien ortho-kératosique pour la peau et épithéliums malpighiens para-kératosiques pour les muqueuses (**Fig. 2**) ; la couche la plus superficielle des épithéliums ortho-kératosiques étant constituée de cellules anucléées à la différence des couches superficielles des épithéliums para-kératosiques (**Fig. 2**).

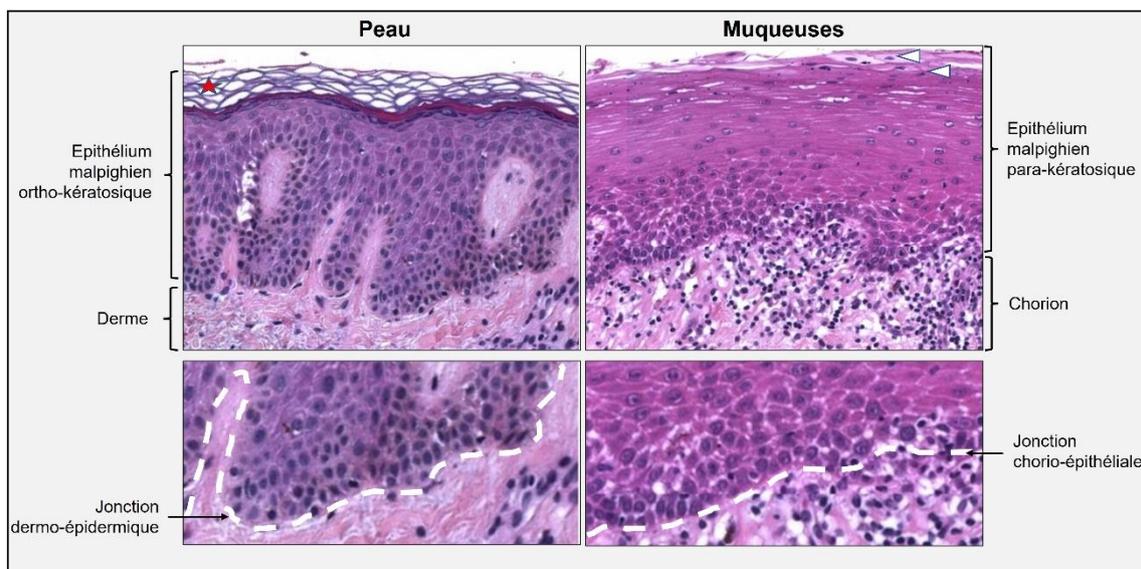


Figure 2. Epithéliums malpighiens de la peau et des muqueuses.

Légende: Etoile rouge : couche cornée des épithéliums ortho-kératosiques ; têtes de flèches blanches : noyaux cellulaires de la couche superficielle des épithéliums para-kératosiques ; tirets blancs : jonction dermo-épidermique et chorio-épithéliale.

3. Système d'adhésion kératinocytaire cibles des auto-anticorps des MBAI

Les lésions cliniques observées chez les patients atteints de MBAI font suite à la perte d'adhésion des kératinocytes du fait de la disruption des systèmes de jonction des kératinocytes entre eux ou entre les kératinocytes et la jonction dermo-épidermique. Ces systèmes de jonction sont des complexes macromoléculaires d'ancrage dont les constituants sont produits par les kératinocytes et/ou les fibroblaste du derme (14). Ces différents systèmes confèrent à la peau et aux muqueuses leur rôle barrière et participent à la communication intercellulaire. Différents types de systèmes de jonction sont présents au pôle latéral et basal des kératinocytes : les jonction communicantes, jonction adhérentes, jonction serrées et jonction d'ancrage. Ceux dont les constituant sont la cible des auto-anticorps mis en évidence dans les MBAI sont de deux types.

a. Adhésion kératinocytes-jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique (JDE), ou chorio-épithéliale (JCE), permet l'intégrité des épithéliums malpighien en assurant l'attachement des kératinocytes basaux à la matrice extra-cellulaire (derme superficiel/chorion). La JCE/JDE est séparée en plusieurs zones distinctes participant à maintenir sa stabilité (15). Les quatre zones de la JDE/JCE sont individualisables en microscopie électronique : hémidesmosomes, lamina lucida, lamina densa et sublamina densa.

Au pôle basal de la membrane plasmique des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, les hémidesmosomes constituent la complexe protéique d'ancrage des kératinocytes à la JDE/JCE (**Fig. 3**). A la partie interne de cette plaque d'ancrage, la plectine (16) et BP230 (*i.e.* BPAG1, Bullous Pemphigoid Antigen 1), de la famille des plakines interagissent avec les filaments intermédiaires de cytokératines (kératine 5 et kératine 14) (17,18). Les protéines BP230 interagissent avec la partie cytoplasmique des deux protéines transmembranaires des hémidesmosomes, BP180 et la sous-unité $\beta 4$ de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (19–21). L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est cruciale à l'adhésion cellulaire car son domaine extracellulaire interagit avec la laminine 332 (ou laminine 5) (22). BP180 (aussi dénommé BPAg2 ou collagène 12) est une glycoprotéine transmembranaire dont la partie N-terminale interagit avec la plectine et BP230 au niveau de la plaque desmosomale. Au niveau de la lamina lucida, BP180 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ interagissent et co-localisent avec la laminine 332 pour constituer les filaments d'ancrage (22,23). La domaine NC16A de BP180 est localisé à la partie haute de la lamina lucida tandis que la partie C-terminale colocalise avec la laminine 5, proche de la lamina densa (24). La partie extracellulaire de BP180 peut être clivée par protéolyse en un ectodomaine de 120 kDa qui est incorporé à la membrane basale au niveau de la lamina lucida (25).

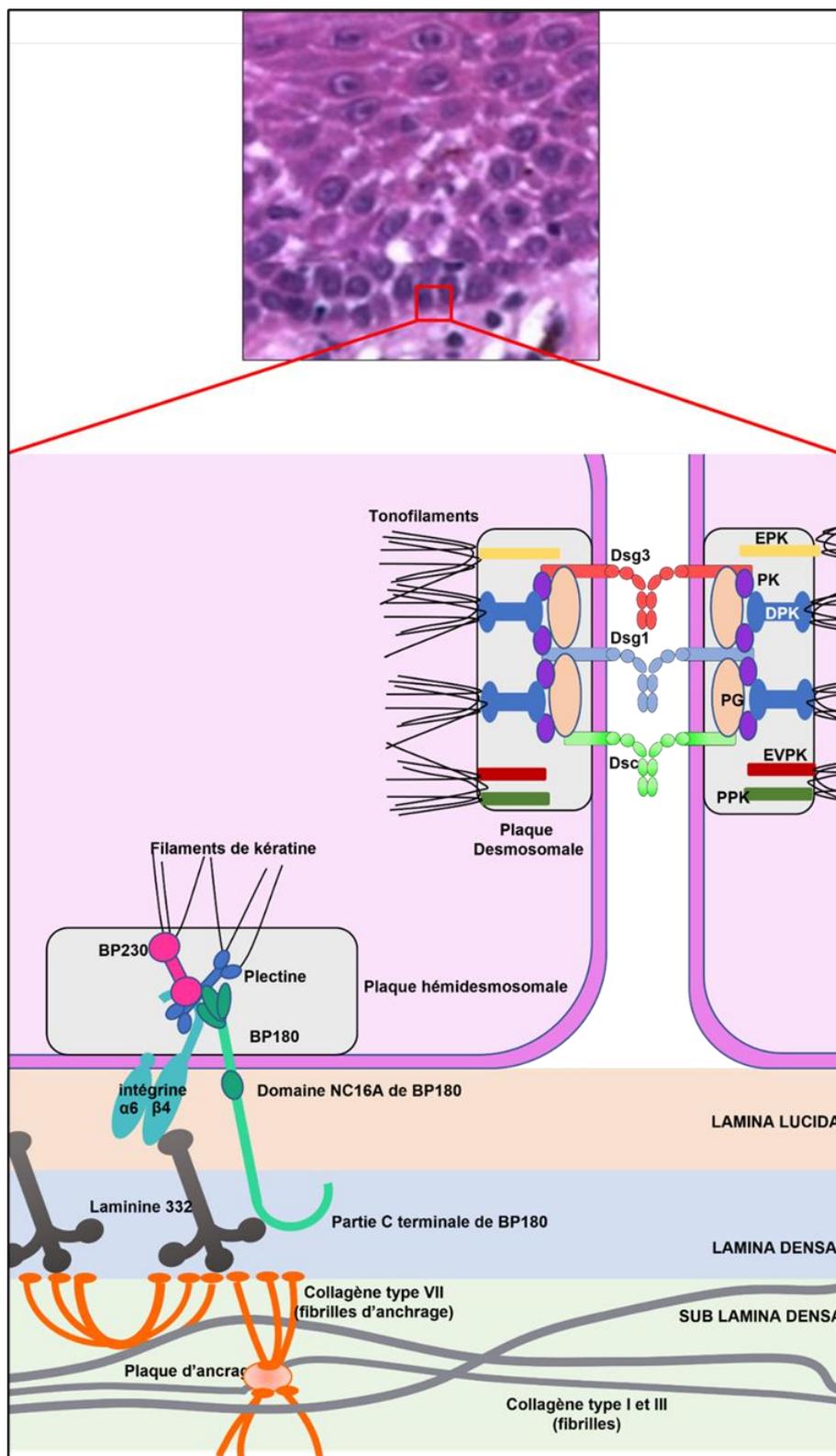


Figure 3 : Systèmes de jonction cibles d'auto-anticorps dans les MBAI : desmosomes, hémidesmosomes et jonction dermo-épidermique (Adapté de Schmidt et al, Lancet 2019 et Egami et al, Front Immunol 2020 (1,3))

Abréviations : BP180 : Bullous pemphigoid antigen 180 kDa ; BP230, Bullous Pemphigoid antigen 230 kDa ; DPK, desmoplakine ; Dsg, desmogléine ; EPK, épiplakine ; EVPK, envoplakine ; PG, plakoglobine ; PK, plakophiline, PPK, périplakine.

La lamina densa est constituée d'un réseau d'isoformes de laminines et de collagène de type IV associé à des glycoprotéines matricielles (perlecane, nidogène, fibuline) (26). La laminine 5 est présente après sécrétion dans la jonction dermo-épidermique et chorio-épithéliale des muqueuses et interagit avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ par la sous-unité alpha3 (27,28). La sublamina densa contient les fibrilles d'ancrages constituées de dimères de collagène de type VII (29,30). Ces fibrilles d'ancrage de collagène de type VII interagissent avec la laminine 5 (31). Ces fibrilles d'ancrages forment un réseau enchevêtré formant des plaques d'ancrage qui s'associent aux fibrilles de collagène de type I et III au niveau du derme superficiel assurant la cohésion de l'épiderme et du derme.

b. Adhésion inter-kératinocytaire

Les desmosomes constituent les structures d'adhésion majeures permettant la cohésion inter-kératinocytaire au sein de l'épiderme et des muqueuses, qui sont déstabilisés dans le groupe des pemphigus (1,3). Un complexe desmosomal inter-kératinocytaire est formé par l'interaction de la partie extra-membranaire des protéines des plaques desmosomales de deux kératinocytes, et par l'association de la partie cytosolique d'autres protéines de la plaque avec les filaments intermédiaires. Ces structures sont visibles en microscopie électronique, notamment la plaque desmosomale sous la membrane plasmique sous forme de plaques électro-denses extérieures et intérieures (**Fig. 4**) (32).

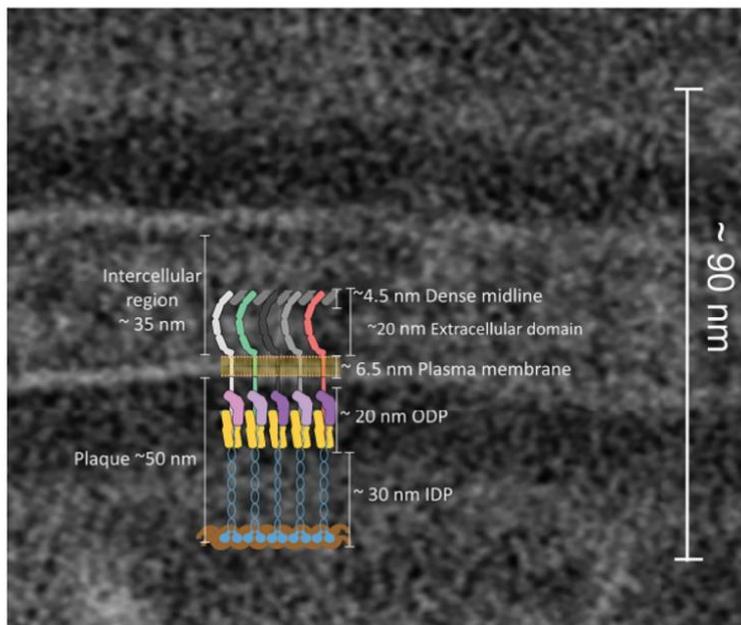


Figure 4. Examen en microscopie électronique montrant un desmosome de peau humaine saine avec représentation schématique de la structure d'un desmosome (*adapté de Egu et al, Frontiers Immunol. 2022 (32)*).

Légendes : IDP : inner dense plaque ; ODP : outer dense plaque.

Les plaques desmosomales sont des structures moléculaires complexes constituées de plusieurs familles de protéines (**Fig. 4**). Les plakines (desmoplakines, périplakine, envoplakine, épiplakine) font le lien entre les filaments de kératines du cytosquelette du kératinocyte et la plaque desmosomale. Ces plakines interagissent par leur domaine N-terminal avec les protéines *Armadillo* et la partie cytoplasmique des cadhérines desmosomales. Les protéines *Armadillo* (plakophiline et plakoglobine) permettent le regroupement des plakines et des cadhérines desmosomales. Les cadhérines sont des glycoprotéines de jonction transmembranaires Ca^{2+} -dépendante et comprennent les desmoglécines (Dsg) et les desmocollines (Dsc) qui assurent la cohésion inter-kératinocytaire par leurs domaines extracellulaires (**Fig. 4**).

La plupart des protéines desmosomales présentent plusieurs isoformes. Il existe 2 isoformes de la desmoplakine, 3 isoformes de la Dsc, et 4 isoformes des Dsg et de la plakophiline. Les différentes isoformes des protéines desmosomales présentent des schémas de distribution variables en fonction des différentes couches du tissu et du niveau de différenciation des kératinocytes (**Fig. 5**) (32). Certaines, comme Dsg2, sont présentes de façon ubiquitaire dans tous les tissus portant des desmosomes au niveau de la couche basale. Dans l'épiderme, les Dsg3, Dsc2 et Dsc3 sont principalement exprimées dans les kératinocytes basaux alors que les Dsg1, Dsc1 et Dsg4 sont exprimées dans les couches plus superficielles (32). Les cadhérines exprimées dans les couches basales sont progressivement remplacées par d'autres lors de la différenciation des kératinocytes (**Fig. 5**). Le même phénomène semble opérer entre les plakophilines 1 et 2. Dans les muqueuses, le même mécanisme est présent avec cependant une expression de Dsg3 sur toute la hauteur de l'épithélium et une expression de Dsg1 très faible dans les couches les plus profondes (**Fig. 5**).

Les cadhérines desmosomales interagissent par des interactions *cis* et *trans* au niveau de leur domaines N-terminaux extracellulaires, avec leur homologues sur la même cellule ou une cellule adjacente, respectivement, formant des structures en forme de nœud (**Fig. 6**) (32). Ces deux types d'interactions participent à la stabilité du complexe bien que les interactions *cis* soient plus faibles. Ces interactions peuvent être homophiliques, entre des cadhérines de même type, ou hétérophiliques, entre des cadhérines de type différent (32). Des études récentes ont démontré que les *trans*-interactions hétérophiliques Dsg1/Dsc1 et Dsg3/Dsc3 sont les plus fortes et donc prédominantes dans l'adhésion desmosomale (33,34).

L'ensemble des constituants des différents systèmes de jonction permet ainsi le maintien de l'adhérence des kératinocytes entre eux ou de l'épithélium à la matrice extracellulaire sous-jacente. Leur absence ou leur modification du fait de mutations génétiques, de leur encombrement et/ou de leur dégradation du fait de la présence d'auto-anticorps peut mener à la perte d'adhésion de l'épithélium, provoquant des lésions bulleuses et érosives dans les maladies bulleuses d'origine génétique ou auto-immunes.

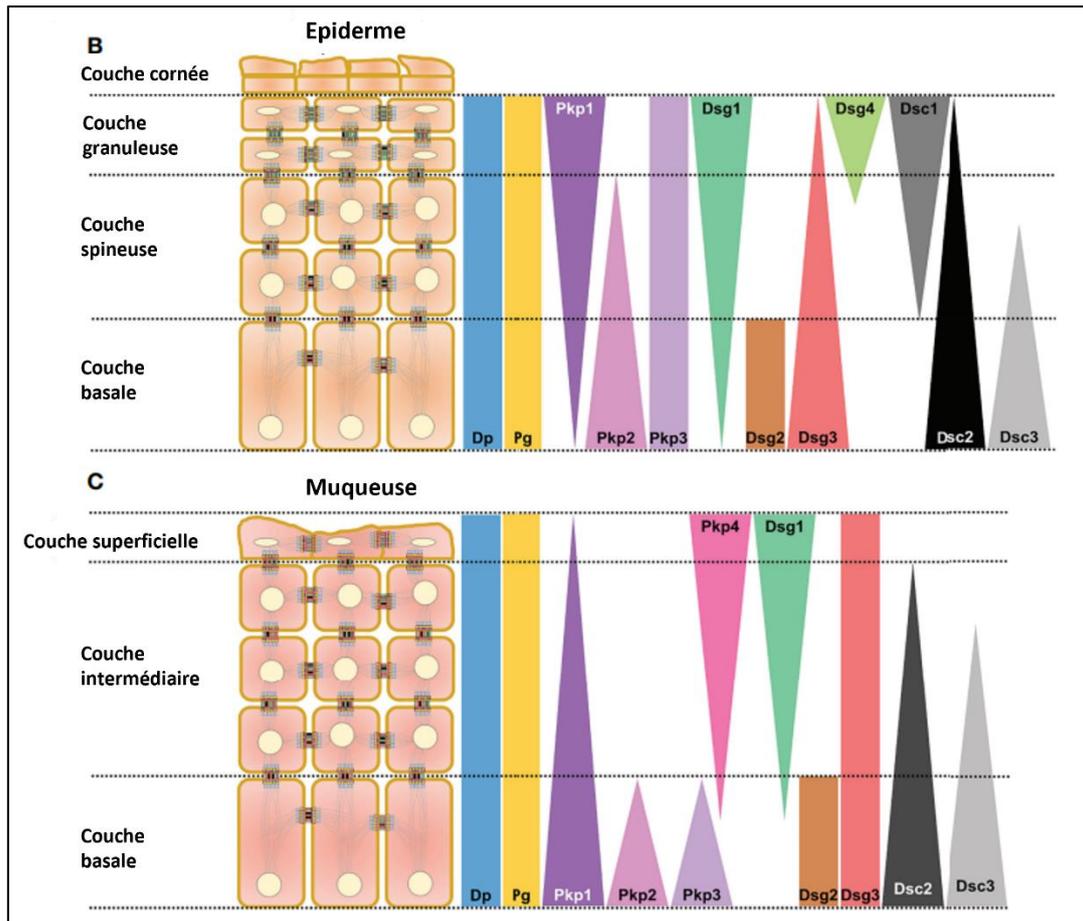


Figure 5. Représentation schématique de la distribution des protéines desmosomales dans les différents couches de l'épiderme (B) et des muqueuses (C) (adapté de Egu et al, Front Immunol 2022 (32))

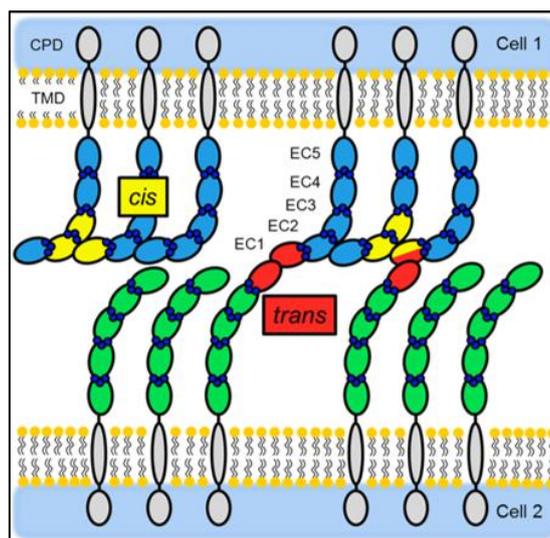


Figure 6. Représentation schématique des interaction *cis* et *trans* des cadhérines desmosomales (provenant de Fichtner et al, Plos One 2014 (35))

4. Les niveaux fonctionnels de la barrière cutanée

Au-delà de la distinction des couches anatomiques de la peau, la plupart des chercheurs distingue quatre niveaux fonctionnels finement orchestrés au sein de la barrière cutanée (**Fig. 7**). Il s'agit de la barrière du microbiome, de la barrière chimique, de la barrière physique et enfin de la barrière immunitaire. Ces barrières ont pour objectif le maintien de l'homéostasie mais aussi la défense et la réparation de l'organisme (5).

Le microbiome est la barrière la plus superficielle de la peau et comprend divers organismes microbiens commensaux (bactéries, champignons, virus) dont la répartition est maintenue stable par leurs interactions mutuelles (36). Ils agissent comme un réseau de surveillance et transmettent des signaux externes au système immunitaire cutané. L'efficacité de cette coopération dynamique entre les cellules épidermiques, le microbiote cutané et le système immunitaire cutané détermine la fonctionnalité de la barrière du microbiome (5).

La barrière chimique est étroitement connectée à la barrière physique et comprend le pH acide de la surface cutanée et les facteurs naturels d'hydratation (NMF, natural moisturizing factors) qui produits par les cornéocytes (5). La barrière physique est composée des kératinocytes et de leur réseau de jonction serrées et adhérentes. Les kératinocytes avec les glandes sébacées participent à la barrière chimique par la production de lipides épidermiques.

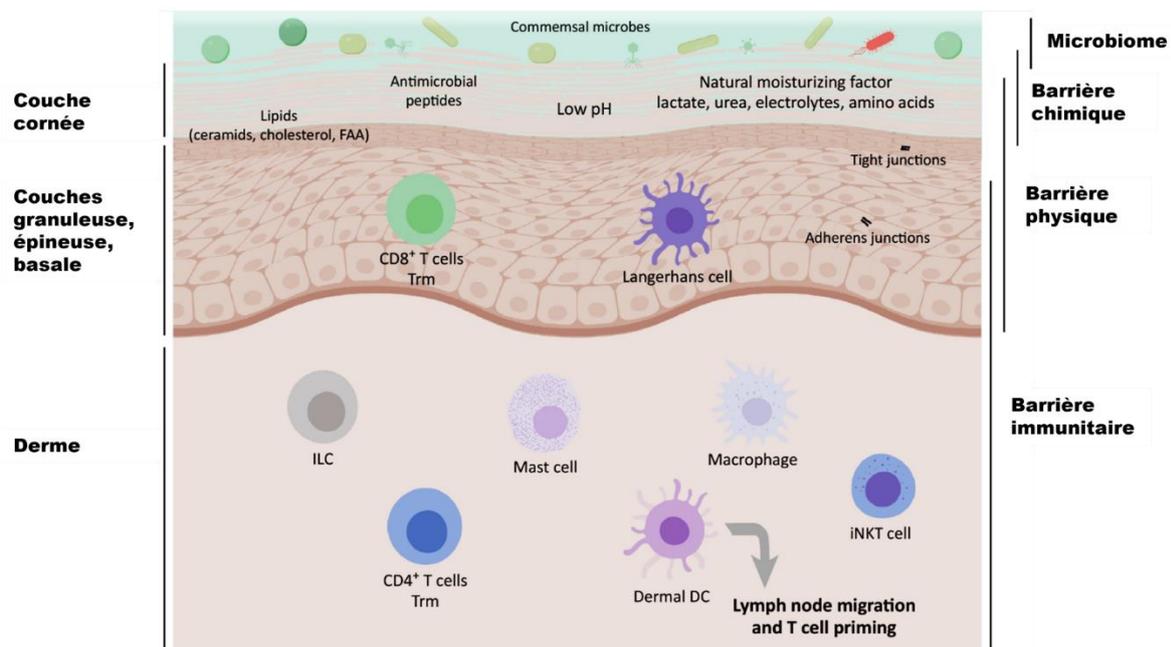


Figure 7. Couches et composants de la barrière cutanée (provenant de Eyerich et al, Trends Immunol 2018 (5))

Abbreviations: FAA, free fatty acids; ILC, innate lymphoid cell; iNKT, invariant natural killer cell; Trm, tissue-resident memory cell.

La barrière immunitaire représente la dernière partie de cette barrière cutanée. Elle comprend une large variété de cellules immunitaires résidentes de l'épiderme et du derme qui vont jouer le rôle de sentinelles régulant la balance immunitaire et permettant la tolérance du soi et des organismes commensaux en condition non pathogène, mais aussi l'activation de l'immunité innée et adaptative contre les organismes pathogènes (**Fig. 7**) (37).

Ce système immunitaire cutané enregistre les signaux de danger moléculaires produits en présence de pathogènes, que sont les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), ou par des dommages cellulaires, que sont les DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) (5). Ces signaux de danger permettent d'activer les intervenants cellulaires (kératinocytes, fibroblastes, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes NK, plaquettes) et moléculaires (complément, cytokines, chémokines) participant à l'immunité innée. En effet, les DAMPs et les PAMPs sont reconnus par des récepteurs reconnaissant les pathogènes (PRR, Pathogen Recognition Pattern), qui sont constituées de plusieurs familles de récepteurs tels que les TLR (Toll-like receptor), les NLR (Nucleotid-binding Oligomerization Domain-like Receptors), les RLR (RIG-I like receptors), et les CLR (C-type lectin receptor) présents à la membrane des cellules de l'immunité innée (38,39).

L'activation des cellules de l'immunité innée entraîne la sécrétion de médiateurs multiples de l'inflammation permettant d'activer les cellules endothéliales et l'afflux de nouveaux intervenants cellulaires sur le site de l'inflammation. Notamment, les CPA résidentes de la peau (LCs et cellules dendritiques dermiques) vont migrer dans les organes lymphoïdes pour éduquer les LT via l'interaction du TCR et du CMH et induire l'activation de l'immunité adaptative. Les principaux intervenant de cette niche immunitaire cutanée et leurs fonctions principales sont présentées dans le **tableau 1** et les acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative sont schématisés dans la **figure 8**.

Composants	Fonction
Cellules Immunitaires	
Polynucléaires neutrophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Reconnaissance et phagocytose de pathogènes - Sécrétion de chimiokines et de médiateurs inflammatoires permettant de recruter et d'activer d'autres cellules immunitaires - Réponse au VEGF et induction de l'angiogenèse
Monocytes/Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose de pathogènes et de débris nécrotiques et apoptotiques - (phénotype M1) production de cytokines inflammatoires (e.g. TNFα, IL1β, IL6) - cellules présentatrice d'antigène initiant l'immunité adaptative - (phénotype M2) production de facteurs de croissance (VEGF, TGFβ) et de cytokines anti-inflammatoires (IL10) - Régulation de la synthèse de collagène par les fibroblastes - Initiation de la résolution de l'inflammation par phagocytose des neutrophiles altérés.
Mastocytes	<ul style="list-style-type: none"> - Production de médiateurs impliqués dans la réponse allergique - Agit comme cellule présentatrice d'antigène initiant l'immunité adaptative
Eosinophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Dégranulation en réponse aux pathogènes, libération de cytokines pro-inflammatoires
Cellules NK	<ul style="list-style-type: none"> - Reconnaissance et destruction d'organismes pathogènes - Favorise la production de lymphocytes T th1 - Sécrétion de cytokines influant sur les LT CD8+ et les cellules dendritiques.
Cellules dendritiques Cellules de Langherans	<ul style="list-style-type: none"> - Surveillance des pathogènes infectieux et des dommages épidermiques - Migre dans les ganglions pour induire la réponse immunitaire adaptative en activant les LT naïfs. - Sécrétion de chimiokines et médiateurs inflammatoires pour recruter et activer d'autres cellules immunitaires et polariser les lymphocytes T. - Favorise l'angiogenèse, le tissu de granulation - Lutte contre les infections par la production d'IFN α/β
Lymphocytes T $\alpha\beta$	<ul style="list-style-type: none"> - Lymphocytes T mémoires résidents - différenciation en lymphocytes T cytotoxiques - Lymphocytes T régulateurs (Treg) permettant de réguler l'inflammation induite par les macrophages et les cellules auto-réactives
Lymphocytes T $\gamma\delta$	<ul style="list-style-type: none"> - Régulent l'inflammation médiée par les T $\alpha\beta$ - Contrôle de la différenciation des kératinocytes - produisent IL17 pour lutter contre les infections
Lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none"> - Surveillance des pathogènes par les LB mémoires résidents et action de CPA - LB régulateurs produisant l'IL10 diminuent l'activation des LT autoréactifs

Autres cellules	
Cellules mésenchymateuses	<ul style="list-style-type: none"> - Favorise la phagocytose des macrophages et inhibe la différenciation et l'activation des monocytes pro-inflammatoires. - Réduit l'inflammation en réduisant la prolifération des LB et LT et en favorisant la différenciation des macrophages anti-inflammatoires et des Tregs
Plaquettes	<ul style="list-style-type: none"> - Recrute et active les neutrophiles, les macrophages et les monocytes. - Production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires
Kératinocytes	<ul style="list-style-type: none"> - Production de cytokines, de chimiokine et de peptide anti-microbien faisant suite à l'activation de PRR multiples. - Promotion de la réponse Th1 par la production d'IFN.
Cytokines	
Cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, IL8, IL12, TNFα, IFNγ)	- Initiation de la réponse immunitaire innée et adaptative, notamment l'activation et le recrutement de neutrophiles, et de mastocytes, la prolifération des LT et la production d'anticorps par les LB.
Cytokines anti inflammatoires (IL4, IL10, IL11, IL13, TGFβ)	- Inhibition de la production de médiateurs et de cellules pro-inflammatoires
Chémokines (MCP-1, SDF-1)	<ul style="list-style-type: none"> - Favorise le recrutement de cellules immunitaires - Intervient dans la cicatrisation
Facteurs de croissance (VEGF, PDGF)	- Recrutement de cellules immunitaire et à la stimulation de la prolifération des neutrophiles et macrophages.

Tableau 1. Fonction des intervenants majeurs du système immunitaire cutané à l'état normal et en réponse à l'infection (adapté de Mu et al, Adv Drug Del Rev 2022(40))

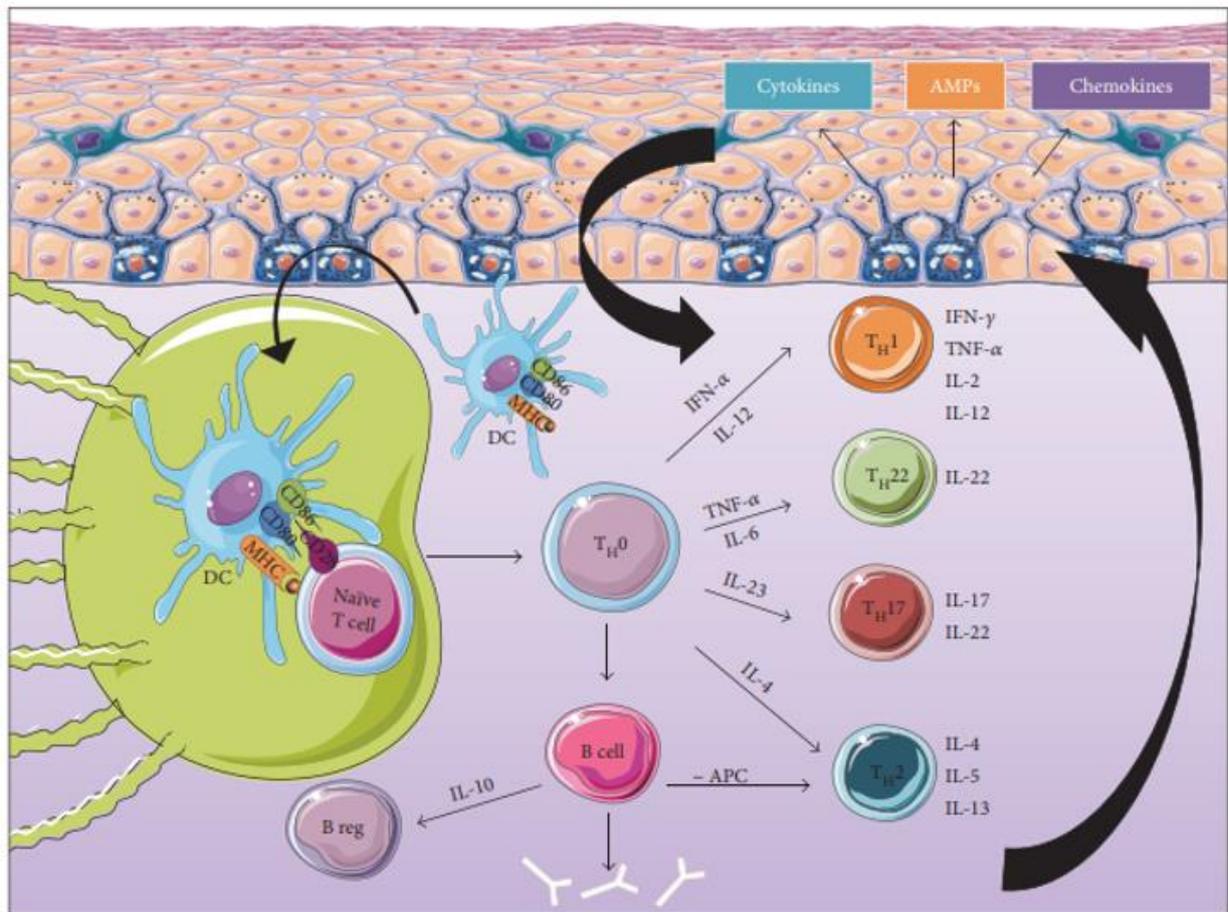


Figure 8. Schématisation des acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative (provenant de Abdallah et al, Mediators Inflamm 2017 (41)).

APC : cellule présentatrice d'antigène ; DC : cellules dendritiques ; T_H : LT auxiliaire ; CMH : complexe majeure d'histocompatibilité ; IFN : interféron ; CD : cluster of differentiation ; IL : interleukine ; TNF : facteur de nécrose tumorale. []

La peau est donc une succession de couches physiques et de barrières fonctionnelles complémentaires permettant l'homéostasie locale et organique. Cependant, l'altération d'une ou l'autre de ces barrières par des conditions pathogènes peut être à l'origine des pathologies dermatologiques infectieuses, allergiques, auto-inflammatoire, tumorale et auto-immune.

B. IMMUNITÉ ADAPTATIVE

1. Acteurs de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est majoritairement initiée par l'interaction de LT spécifiques d'un antigène avec des CPA présentant l'antigène appaîré par des molécules de CMH. L'activation des LT nécessite la présence d'un signal, constitué par la présence d'un antigène internalisé puis présenté par une CPA ; sa transmission grâce à l'interaction entre CPA et LT via la reconnaissance par le récepteur des LT

(TCR) du complexe CMH-antigène et grâce à des molécules de costimulation ; et son amplification par la production de cytokines qui en présence de récepteurs adaptés vont entraîner la prolifération et l'activation des cellules effectrices (**Fig. 8**) (42).

Cette activation des LT s'opère dans les organes lymphoïdes secondaires où les antigènes du non-soi parviennent grâce à la migration de CPA résidentes des tissus périphériques ou directement par la lymphe avant d'être captés par des CPA spécialisées présentes dans les ganglions (43). Ces antigènes sont présentés, après apprêtement, par diverses CPA professionnelles ou non-professionnelles (macrophages, cellules dendritiques (DCs), ou lymphocytes B (LB)) à des LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs par des molécules de CMH de classe II et classe I respectivement. Les molécules de CMH de type I (CMHI) et du CMH de type II (CMHII) sont des protéines présentant les peptides antigéniques aux cellules du système immunitaire adaptatif (44) ; les molécules du CMHI sont présentes sur la plupart des cellules nucléées alors que celle du CMHII sont exprimées par les CPA (44). Ces CPA activées ont une expression importante de CMHI et de CMHII, de molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) et produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (42). L'activation des LT naïfs dépend d'interactions dynamiques et stables entre les LT et les DCs (liaison TCR/couple CMH-peptide) dépendantes de l'affinité et de l'avidité du TCR mais aussi de la dose d'antigène présenté (45). L'activation des LT naïfs par les CPA va permettre leur prolifération en sélectionnant les clones réagissant le mieux à l'antigène présenté, permettant ainsi la production de LT effecteurs et mémoires spécifiques de l'antigène.

2. TCR et BCR

La prolifération, la maturation et la sélection des lymphocytes T et des lymphocytes B dépend de la qualité de la reconnaissance l'antigène du non-soi par des récepteurs spécifiques d'antigènes présents à leur membrane. Ces récepteurs (TCR et B cell receptor (BCR)) ont des répertoires variés provenant de la recombinaison des segments géniques V(D)J codant leurs différentes parties (46,47).

Les TCR sont des molécules hétérodimériques uniques, spécifiques d'un antigène, composées de sous-unités α et β constituées de domaines d'Ig constants et variables ; au sein des régions variables, les régions hypervariables, constituent la surface de liaison spécifique au complexe CMH-peptide (48). La recombinaison génétique du TCR a lieu dans le thymus permettant leur sélection positive dans la corticale thymique (48).

Le BCR est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des immunoglobulines présent à la membrane des précurseurs de LB dans la moelle osseuse (49). Le BCR est composé de deux chaînes lourdes (chaînes H) et de deux chaînes légères (chaînes L) reliées par des ponts disulfure. Chaque chaîne est constituée de domaines variables (V) N terminaux et de domaines constants C terminaux (C). Comme pour le TCR des LT, la partie variable du BCR des LB est produite lors du processus de recombinaison VDJ par réarrangement somatiques de gènes (49). Comme pour les LT, le

domaine variable contient des régions hypervariables (CDR). Ces 6 CDR sont responsables de la reconnaissance de l'antigène tandis que la partie constante transduira le signal. À la suite de cette recombinaison VDJ, les LB immatures exprimeront à leur surface une immunoglobuline de type M (IgM).

3. Lymphocytes T

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle prépondérant dans l'immunité adaptative de par leur intervention dans l'orchestration du type de réponse immunitaire et par leur rôle dans la tolérance aux auto-antigènes et antigènes de l'environnement. Les LT CD4⁺ naïfs (Th0, T helper 0) peuvent en effet se différencier en sous-populations de LT ayant une rôle propre en lien avec l'expression de profils cytokiniques différents (50,51). Parmi ces sous-populations figurent les LT régulateurs (Tregs) et les LT effecteurs (Teff) : Th1, Th2, Th17, Th22 ayant une action pro-inflammatoire (51).

Les lymphocytes Th1, qui se différencient en présence d'IL-12, assurent une protection contre les agents pathogènes et les virus (51). Ils produisent notamment l'IFN γ après avoir exprimé le facteur de transcription T-Bet (T-box expressed in T cells) (52) (**Fig. 8**). La voie Th1 va notamment favoriser l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques qui permettent de lutter contre les cellules infectées ou tumorales via la sécrétion de perforine, de granzyme ou qui induisent la mort cellulaire par contact Fas-FasL. Ces LT CD8⁺ ont préalablement été activés par la reconnaissance par leur TCR d'un peptide présenté par des CPA sur des molécules de CMHI.

Les lymphocytes Th2 secrètent de l'IL-4 et de l'IL-13 permettant la maturation des LB en plasmocytes, sécréteurs notamment d'IgE, et de l'IL-5 qui active les éosinophiles (53). Ils sont impliqués dans la réponse antiparasitaire et les phénomènes allergiques.

Les lymphocytes Th17, différenciés en présence d'IL-6 et de TGF β , ont pour rôle de lutter contre les infections bactériennes extracellulaires et fongiques ; ils produisent de l'IL-17A, de l'IL17F, de l'IL-21, de l'IL-22 et du TNF α sous le contrôle du facteur de transcription ROR γ T (RAR-related Orphan Receptor γ T) (54).

D'autres LT CD4⁺, présents dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, les Tfh (T cell follicular helper) jouent un rôle prépondérant dans l'immunité humorale en interagissant avec les lymphocytes B naïfs, permettant leur maturation (55).

4. Lymphocytes B

a. Les sous-populations lymphocytaires B

Les précurseurs des LB sont produits dans la moelle et vont passer par les stades pro-LB, pré-LB et immature LB, stades au cours desquels les LB vont réarranger leur BCR puis exprimer une IgM de surface (**Fig. 9**) (56). C'est au stade LB immature que s'opère la sélection des LB s'assurant d'une

reconnaissance adaptée de l'antigène avant de passer dans la circulation (56). Ces LB passent par le stade de LB transitionnels puis de LB naïfs avant de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Ces LB transitionnels et naïfs expriment en surface une IgD en plus de leur IgM de surface, mais n'expriment pas le CD27 (56). Ces LB naïfs entrent ensuite dans les organes lymphoïdes pour proliférer au sein de centres germinatifs au contact des cellules Tfh et procéder aux modifications de leur Ig par la commutation isotypique et l'hypermutation somatique qui permettent des réponses humorales de forte affinité en situation pathogène (49). Lors de la commutation isotypique, le type d'Ig produite par le LB change, sans modifier sa spécificité antigénique, par une recombinaison de l'ADN des régions situées en amont des gènes CH (57). Le processus d'hypermutation somatique introduit des mutations ponctuelles dans les régions hypervariables des Ig, permettant de sélectionner dans le centre germinatif ceux ayant la plus forte affinité pour l'antigène cible (57). Les LB se différencient alors en LB mémoires T-dépendant et en plasmocytes (plasmablastes et long-lived plasma cells) qui produiront les différentes sous-classes d'immunoglobines (IgA, IgG, IgE, IgM) spécifiques des antigènes cibles (**Fig. 9**). Certains LB mémoires, notamment porteur d'IgM, pourraient entrer à nouveau dans le centre germinatif en passant par un stade double négatif (IgD-CD27-). Par ailleurs, certains LB pourraient s'activer en dehors du centre germinatif de manière T-indépendante (**Fig. 9**). Le **tableau 2** expose les marqueurs phénotypiques caractéristiques des différentes sous-populations de LB transitionnels, naïfs, mémoires et des plasmablastes/plasmocytes (49). Bien que 7 marqueurs permettent de différencier les différentes sous-population de LB correspondant aux 9 stades canoniques de maturation, les données récentes de single-cell RNA sequencing (sc-RNA-seq) sont à l'origine de changements dans la compréhension de la maturation des LB (49). Ainsi, de multiples phénotypes sont mis en évidence en sc-RNA-seq, suggérant l'existence de 10 sous-types de LB dans le sang humain, 12 à 13 dans les tissus lymphoïdes et 14 dans les organes périphériques (58–60).

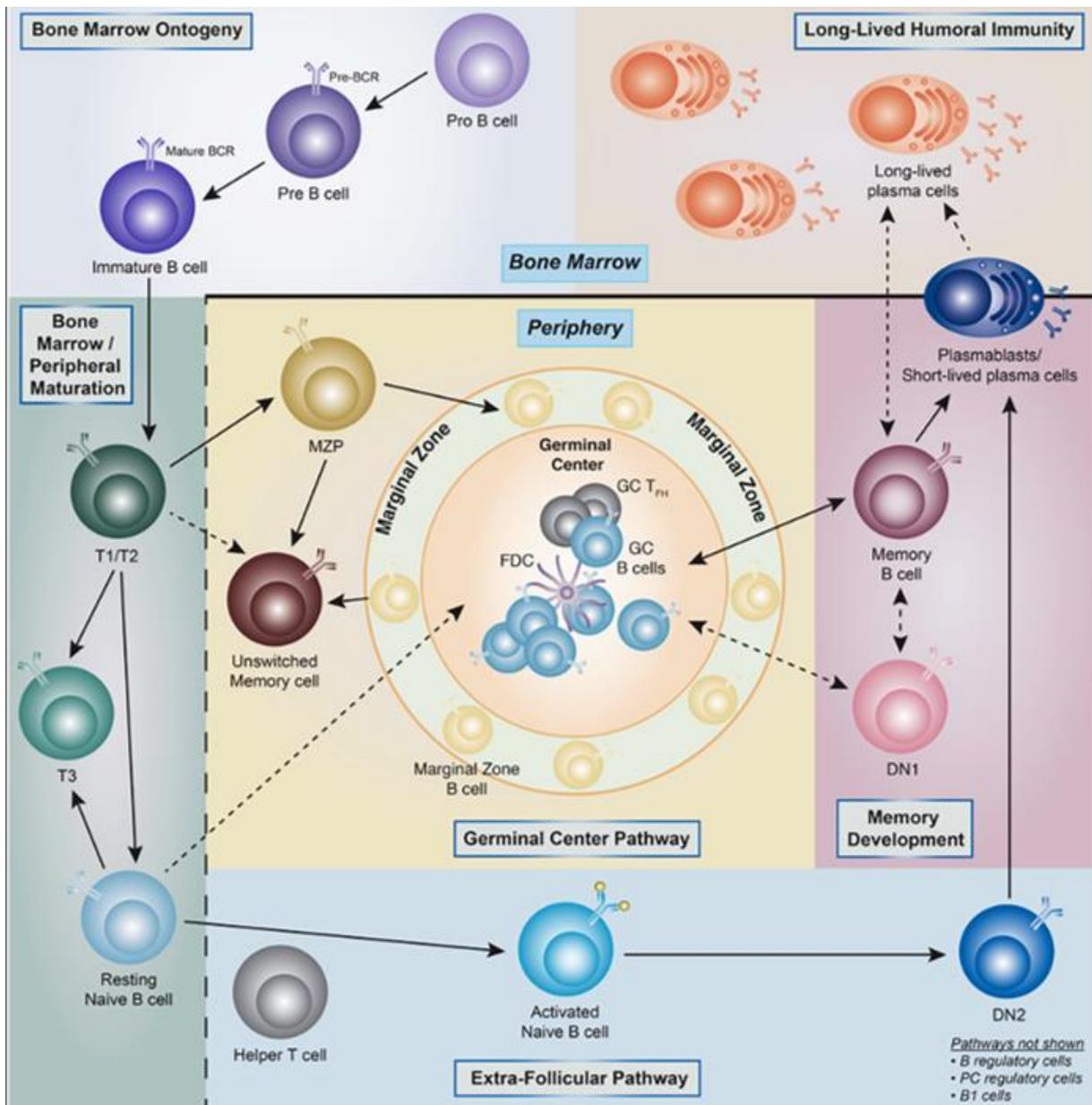


Figure 9. Ontogénese des lymphocytes B humains. Illustration provenant de Sanz et al, Front Immunol 2019 (56).

T1, transitional type 1 B cells; T2, transitional type 2 B cells; T3, transitional type 3 B cells; MZP, marginal zone precursor B cells; DN1, double-negative (IgD⁻ CD27⁻)-1 B cells; DN2, double-negative (IgD⁻ CD27⁻)-2 B cells; GC, germinal center; FDC, follicular dendritic cell.

LB (CD19+ sauf mention contraire)		Marqueurs de base	Marqueurs additionnels	Fonction
Transitionnels	T1/T2	IgD+ CD27- CD38++ CD24++	CD10++ IGM++ MTG+	Précurseur
	T2-MZP	IgD+ CD27- CD38++ CD24++ CD21++	CD10+ IGM++	Précurseur de la MZ
	T3	IgD+ CD27- CD38+ CD24+ CD21+	CD10+/- IGM+ MTG+	Précurseur
Naïfs	Repos	IgD+ CD27- CD38+ CD24+ CD21+	IGM+ MTG-	LB mature n'ayant pas reconnu d'Ag
	Activées	IgD+ CD27- CD38- CD24- CD21-	IgM+ MTG+ CD95+ CD23+ CD11c+ T-bet+ FcRL5+ SLAMF7+ CXCR5-	Précurseur des LB du CG et des PB de courte durée de vie
	Anergiques	IgD+ CD27- CD38+/low CD24- CD21-	IgMlow/-	Tolérance
Mémoires	Non-switchés	IgDlow CD27+ CD38+/low CD24+ CD21+	CD1c+ IGM++	Mémoires naturels
	Pré-switchés	IgD- CD27+ CD38+/low CD24+ CD21+	IgM++	Mémoires pré-switchés
	Switchés au repos	IgD- CD27+ CD38+/low CD24+ CD21+	IgG/IgA+CD95-	Réservoir LB mémoire
	Switchés activées	IgD- CD27+ CD38- CD24- CD21-	IgG/IgA+CD95+CD86+	Mémoires effecteurs, précurseur de PB/PC
	Atypiques, tissulaires	IgD- CD27- CD38low CD24low CD21-	FcRL4+ IgM/IgA/IgG+ FcRL5+	Surveillance muqueuse, mémoires épuisés, mémoire à BCR hypo-répondeur
Double négatifs	DN1	IgD- CD27- CD38+ CD24+ CD21+	FcRL4+ IgM/IgA/IgG+ FcRL5- CXCR5+	Précurseurs mémoires
	DN2	IgD- CD27- CD38- CD24- CD21-	IgM/IgA/IgG+ CD11c+ FcRL5+ CXCR5- T-bet+ SLAMF7+ FcRL4+	Précurseurs extra folliculaire de CSA Mémoires tissulaires
CSA	PB précoces	IgD- CD27low/+ CD38++ CD24-	CD20+/- HLA-DR+ CD138-	Précurseur de PB dérivé de LB naïfs ou mémoires

	PB	IgD- CD27++ CD38+++ CD24-	CD20- HLA-DR+ CD138- Ki67+	Sécrétion d'anticorps
	PC	IgD- CD27++ CD38+++ CD24-	CD19+/- CD20- CD138+	Sécrétion d'anticorps

Tableau 2. Principaux marqueurs des LB transitionnels et matures hormis LB régulateurs, PC régulatrices et cellules B1 (modifié d'après Sanz I et al, Front Immunol, 2019 (56))

Abréviations : CSA, cellules sécrétrices d'anticorps ; DN, double négatifs ; PB, plasmablastes ; PC, cellules plasmatisques ; CG, centre germinatif ; MZ, zone marginale.

b. Les Anticorps

La réponse immunitaire adaptative humorale aboutit à la sécrétion d'anticorps produits par les plasmablastes (PB) et les plasmocytes (PC) (61). Plusieurs classes d'anticorps sont produits par les LB. Les IgM sont la classe initiale d'anticorps et peuvent être trouvés sous forme de BCR associé à la membrane des LB immatures ou sous forme circulante produite par les LB naïfs activés (61). Comme toutes les Ig, les IgM comportent deux chaînes lourdes couplées entre elles et deux chaînes légères identiques couplées aux chaînes lourdes. Sous forme circulante, les IgM s'organisent en pentamère et constitue un activateur important de la voie classique du complément (62).

La commutation isotypique permet de former d'autres classes d'immunoglobulines (IgG, IgA, IgE, IgD) permettant au système immunitaire de reconnaître chaque antigène d'une manière spécifique induisant des réponses effectrices spécifiques (61). D'autre part, les IgA et les IgG sont subdivisés en 2 et 4 sous classes respectives (IgA1-2 et IgG 1-4). La répartition et/ou la fonction de ces sous-classes sont différentes (61). Les différents isotypes d'Ig sont présents en quantités variables dans le sérum et ont tous une distribution biologique et une fonction différente, induits par des facteurs déclenchant spécifiques (**Tableau 3**). Hormis les IgM, les Ig agissent sous forme monomérique sauf les IgA sécrétoires qui agissent sous forme dimériques dans les tissus muqueux. Certains agissent en activant le complément et par opsonisation (IgG, IgM), ou en étant reconnu par diverses molécules *via* leur fragment Fc (**Tableau 3**).

Les IgG sont les Ig les plus nombreuses en quantité dans le sérum et sont impliquées dans la majorité des réponses humorales allo et auto-immunes (63). Bien que les sous-classes d'IgG partagent 90% d'acides aminés communs, chaque sous-classe a une fonction unique du fait de leur structure, de particularités de liaison à l'antigène, de propension à former de complexes immuns, de propriétés d'activation du complément, de capacités de liaison au Fc γ R (Fc gamma receptor), de durée de vie et de transport transplacentaire (61,63). Les domaines Fc des anticorps sont la cible de nombreuses protéines, incluant des récepteurs présents sur les cellules myéloïdes. La plupart des activités biologiques des IgG dépendent de l'interaction du Fc avec ces molécules effectrices qui comprennent les Fc γ R, 2 membres de la famille FcRL (Fc Receptor-Like, FcRL4 et FcRL5), le C1q, le récepteur néonatal du fragment Fc

(FcRn) et TRIM21 (tripartite motif-containing protein 21) (**Fig. 10**). Ces molécules vont permettre les mécanismes effecteurs dépendants du fragment Fc : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) (61).

Isotype	% des Ig sériques	Structure fonctionnelle	Fixation au complément	Opsionisation	Récepteurs fixant la partie Fc	Rôle
IgG	75%	Monomère	+	+++	FcγR	Réponse secondaire
IgG1	67%*		+	+++	I, II, III	
IgG2	22%*		+	+++	II	
IgG3	7%*		+	+++	I, II, III	
IgG4	4%*		-	-	I, II	
IgM	10%	Pentamère	+++	+		Réponse primaire
IgA 1-2	15%	Monomère, dimères	-	-	FcαR	Réponse muqueuse
IgD	<0.5%	Monomère	-	-	FcδR	
IgE	<0.01%	Monomère	-	-	FcεR I, II	Réponse allergique et antiparasitaire

Tableau 3. Isotypes et sous classes d'immunoglobulines (traduit de Schoeder et al, J All Clin Immunol, 2010 (64))

*pourcentage des IgG totales

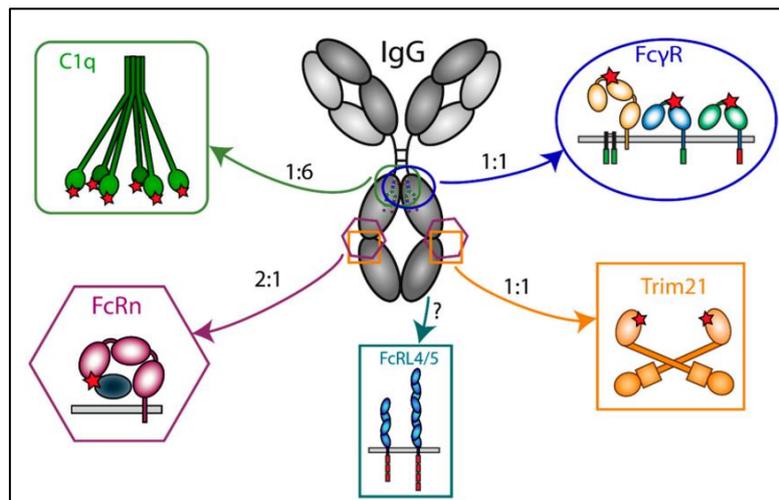


Figure 10. Représentation schématique des interactions des IgG avec les molécules effectrices se liant au fragment Fc par lesquelles les anticorps exercent leur activité biologique. (Figure provenant de De Taeye E et al, Antibodies 2019 (61))

Les étoiles rouges représentent le site de liaison des IgG sur la partie effectrice du Fc.

Il existe 3 classes de Fc γ R chez l'humain, chacun possédant 2 isoformes A et B, qui diffèrent par leur affinité pour le fragment Fc et pour certaines sous-classes d'Ig. En fonction des motifs composant leur domaine intracellulaire (motifs ITAM ou ITIM), ces Fc γ R peuvent avoir une fonction d'activation ou d'inhibition.

Le FcRn permet lui de protéger les Ig de la dégradation lysosomale au seins d'endosomes des tissus épithéliaux et du tube digestifs avant de les relarguer dans le milieu extracellulaire, prolongeant ainsi leur durée de vie et permettant l'activation d'acteurs immunitaires impliqués dans l'activation mais aussi dans la tolérance (61,65).

Certains processus modifiant le fragment Fc des IgG peuvent influencer sur la fonction effectrice des anticorps. Ainsi la N-glycosylation de la partie Fc des IgG affecte leurs capacités de liaison au Fc γ R et l'activation du complément (61). Ces propriétés de N-glycosylation sont notamment utilisées dans le domaine thérapeutique pour produire des anticorps monoclonaux défucosylés permettant d'augmenter l'ADCC (66). Des variations allotypiques des chaînes lourdes sont aussi à l'origine d'un polymorphisme des sous-classes d'IgG pouvant affecter leur fonction (61).

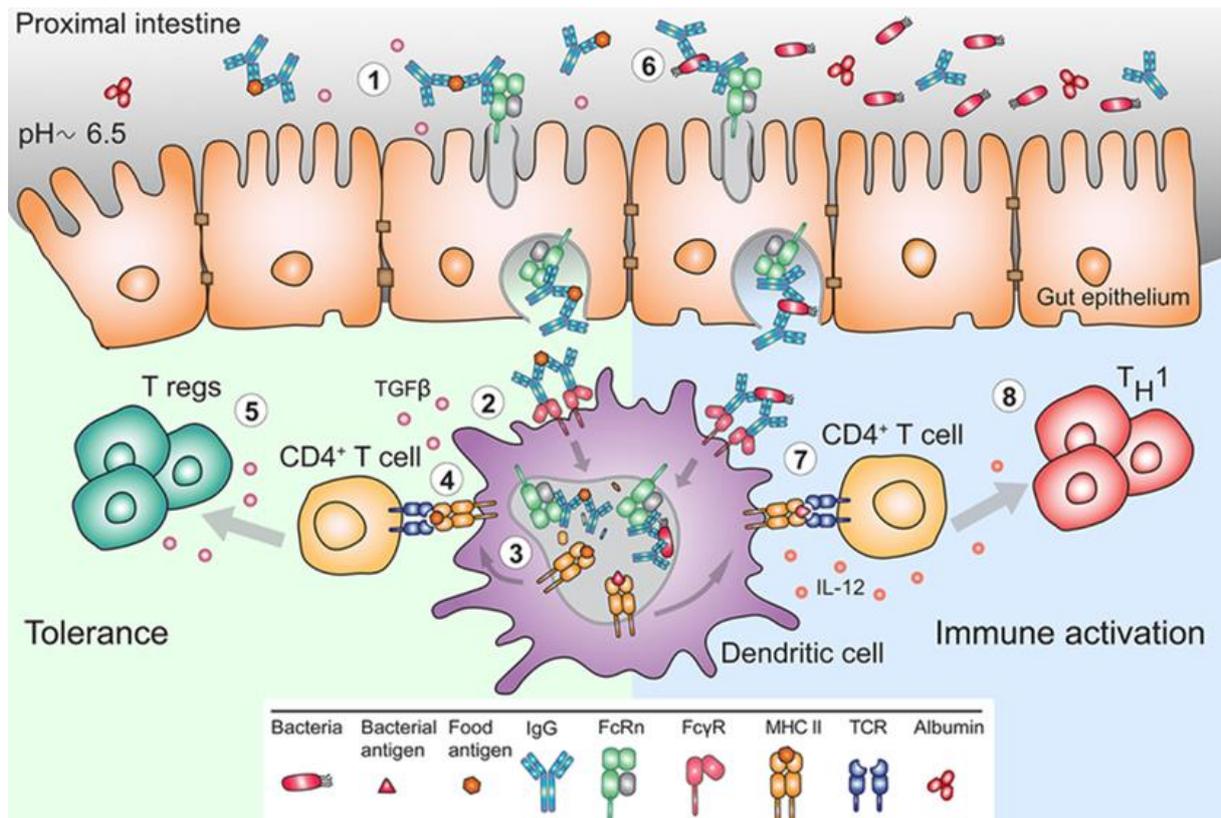


Figure 11. Le FcRn assure le transport bidirectionnel et médie la réponse immunitaire aux IgG et aux complexes immuns d'IgG dans l'intestin (provenant de Pyzik et al, Front Immunol. 2019 (65))
 (1) Le FcRn se lie aux IgG et complexes d'IgG présents à la surface cellulaire et assure leur transcytose au pôle basolatéral. (2) Les CPA se lient aux complexes d'IgG et les internalisent par l'intermédiaire du FcγR. (3) Dans les CPA, le FcRn aide au traitement de l'antigène en livrant les IgG aux compartiments de chargement de l'antigène où les peptides seront chargés sur le CMH II pour être présentés aux LT CD4+. (4) Au début de la vie, cette présentation en présence d'autres facteurs dérivés du lait maternel fournit un environnement tolérogène aux LT CD4+, permettant l'induction de Tregs (5). À l'âge adulte, pendant les infections, les antigènes dérivés de l'agent pathogène liés aux IgG de la lumière (6) sont transportés à travers la muqueuse par le FcRn, délivrés aux CPA qui le présente pour activer les cellules pro-inflammatoires du système immunitaire (7-8)

5. Mécanismes permettant la tolérance immunologique

Afin d'éviter d'endommager les tissus sains de l'organisme, de nombreux mécanismes de régulation de l'immunité sont mis en place au sein des tissus lésés et des organes lymphoïdes pour prévenir l'emballement des réactions immunitaires. L'ensemble de ces mécanismes permettant d'éviter la destruction du soi sont regroupés sous le terme de tolérance immunologique et permettent l'anergie du système immunitaire envers les antigènes du soi.

La tolérance immunologique s'opère à plusieurs niveaux, aussi bien dans les organes lymphoïdes primaires où sont produits les LT et les LB (tolérance centrale) que dans les tissus périphériques et les

organes lymphoïdes secondaires (tolérance périphérique). Une partie de cette tolérance réside dans le phénomène d'ignorance ; à savoir que certains sites immuno-privilégiés comme les yeux, le cerveau ou la peau, vont séquestrer leur antigènes derrière des barrières anatomiques qui empêcheront la rencontre des lymphocytes et de ces antigènes en condition physiologique (67).

a. Tolérance immunitaire T

Tolérance T centrale

Les LT sont produits au sein du thymus où ils passent par un processus de sélection basé sur le niveau de reconnaissance par le TCR de complexes antigène/CMH du soi présents sur les cellules épithéliales thymiques (TECs), qui se comportent comme des CPA multipotentes (68). Ces TECs, au sein de la corticale et de la médullaire thymique (mTECs), participent à la sélection positive puis négative des thymocytes en évaluant la reconnaissance du CMH puis de complexe antigène/CMH par le TCR des thymocytes (68). Grâce à l'expression de facteurs de transcription AIRE (autoimmune regulator) et FEZF2 (FEZ family zinc finger 2), les mTECs ont un rôle critique dans la tolérance car elles sont à même de présenter un nombre très important d'antigènes dont l'expression est normalement restreinte à divers tissus du soi (69,70). Après avoir subi la sélection positive au sein de la corticale thymique, qui s'assure de la reconnaissance du CMH par les TCR, les LT double positifs subissent une sélection négative permettant d'éliminer les LT possédant un TCR ayant une trop forte affinité et/ou avidité avec le complexe auto-antigène/CMH du soi (68). Les LT reconnaissant le complexe auto-antigène/CMH par une interaction de force intermédiaire ou faible matureront en LT conventionnel naïfs (68). Cependant, certains lymphocytes ayant un TCR à interaction intermédiaire vont se différencier en Treg thymiques (tTreg) sous la dépendance de cytokines. Les précurseurs de tTreg vont maturer sous la dépendance signaux de costimulation dépendants des CPA centrales (CD28 – CD80/CD86) et de l'IL-2 jusqu'à exprimer un phénotype Treg mature CD25+FoxP3+ (71,72).

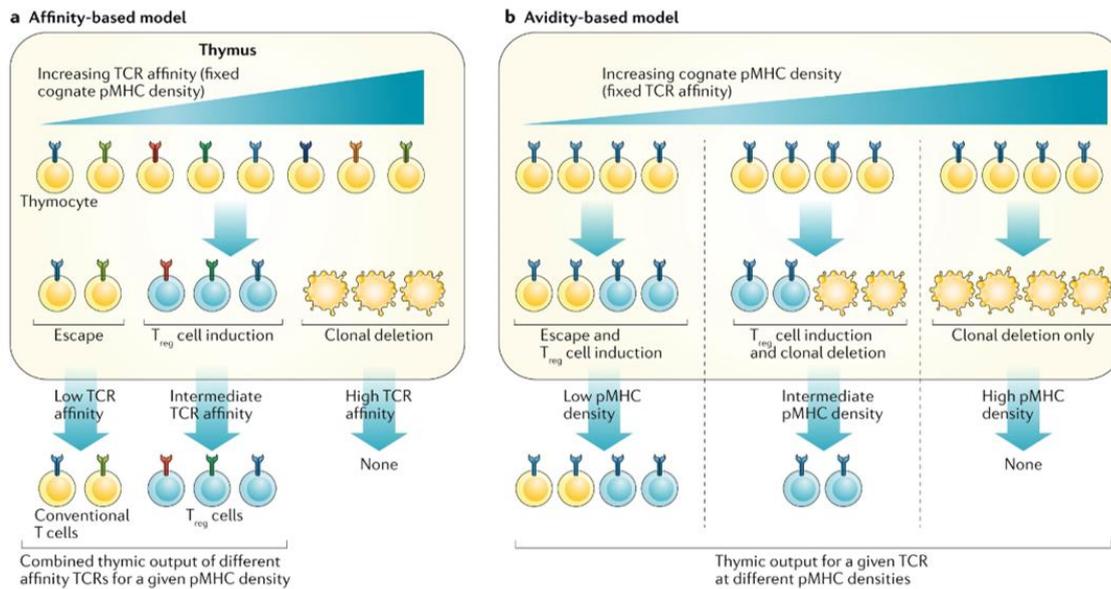


Figure 11. Représentation schématique de la tolérance centrale des lymphocytes T (provenant de Klein et al, Nat Rev Immunol, 2019 (73))

Tolérance T périphérique

Malgré la mort de plus de 95% des LT à la suite du processus de sélection thymique (68,73), certains LT sortant de ce processus présenteront un potentiel auto-réactif. Plusieurs mécanismes périphériques permettent alors de limiter le risque d'auto-immunité. D'une part, la reconnaissance seule d'un antigène par le TCR ne permet pas au LT de s'activer en absence de signaux de costimulation qui seront délivrés par les CPA (costimulation CD28 – CD80/CD86). En absence de processus inflammatoire et de CPA activées, les LT autoréactifs restent donc anergiques.

D'autre part, les Treg permettent le maintien de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Ces lymphocytes T CD4⁺ expriment CD25 (chaîne α du de l'IL-2R) et le facteur de transcription FoxP3 (74,75). Parmi les Treg, on distingue les tTreg générés dans le thymus au cours du processus de sélection et les Treg périphériques (pTreg) (76,77). Ces pTreg sont produits en périphérie à partir de lymphocytes T CD4 naïfs (Th0) par la reconnaissance de peptides antigéniques exogènes auxquels l'organisme est exposé de manière chronique en condition non inflammatoire, en présence de DC et d'un environnement cytokinique adapté (TGF β et IL-2) (76–80). Ces pTreg participent ainsi à une tolérance acquise localement et non de manière centrale. Les Treg jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie en condition physiologique, notamment dans la tolérance materno-fœtale et dans la régénération des tissus lésés. Un défaut quantitatif ou qualitatif en Treg favorise le développement de maladies auto-immunes ou allergiques. Les Treg exercent leur action immunosuppressive par plusieurs moyens ; via la sécrétion de cytokines immunomodulatrices (IL-10, TGF β , IL35), qui vont agir sur la différenciation des autres acteurs cellulaires, notamment des T effecteurs ; via contact cellulaire par l'interaction de CTLA-4 avec

les protéines de costimulation CD80/86 des CPA, diminuant localement les molécules de costimulation disponibles pour les cellules pro-inflammatoires, et en modifiant la fonction des DCs qui vont inhiber les LT effecteurs par la production d'IDO (enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase) (81–83) ; via une cytotoxicité directe au dépend des T effecteurs dépendant du système perforine/granzyme (84) ; via des changements de l'environnement métabolique locale en privant les cellules effectrices de certaines cytokines (IL-2) ou de nucléotides du milieu qui sont captés par les Treg (81).

Par ailleurs, d'autres lymphocytes T CD4⁺ n'exprimant pas Fox-P3 ont démontrées une action immunosuppressive. Ainsi, les lymphocytes Th3 et Tr1 induits en périphérie à partir de lymphocytes Th0 produisent à des niveaux élevés du TGFβ (Th3) ou de l'IL-10 et du TGF β (Th1) leur conférant des propriétés immunosuppressives (85,86).

b. Tolérance immunitaire B

Tolérance B centrale

Jusqu'à 75% des LB immature sont autoréactifs (87,88). Lorsque ces LB immatures porteurs d'un BCR auto-réactif rencontrent leurs antigènes cibles, ils ne recevront pas de costimulation les laissant dans un état d'anergie. Ils seront ensuite éliminés par délétion clonale, par apoptose, ou bien seront secourus par le processus d'édition du BCR (88). Ce dernier comprend le réarrangement et l'expression de nouvelles chaînes légères d'immunoglobulines permettant de diminuer l'auto-réactivité du BCR et la reprise de la maturation du LB en cas de réussite (**Fig. 12**).

Tolérance B périphérique

Malgré les mécanismes de tolérance centrale, environ 20% de LB matures naïfs atteignant la périphérie sont autoréactifs chez les individus sains (89). Ces LB autoréactifs permettraient d'éviter les trous dans le répertoire des LB qui pourraient servir de refuge à des pathogènes exprimant des antigènes proches des antigènes de l'hôte (90). Ces LB participent notamment à la réponse anti-infectieuse via le processus de rédemption clonale (**Fig. 12**) (91). La tolérance périphérique des LB auto-réactif est dépendante de la balance activation par les lymphocytes Tfh / répression par les Treg pour les réponse antigénique T dépendantes dans les organes lymphoïdes secondaires. D'autres mécanismes mènent à l'apoptose ou à l'anergie des LB auto-réactif. Ces mécanismes passent par le masquage des sites de liaison du BCR ou par l'activation de corécepteurs inhibiteurs du BCR appelés Siglec (Sialuc acid-binding immunoglobuline-type lectin) (92,93). Ces LB autoréactifs anergiques et non fonctionnels ont une durée de vie réduite de 80% du fait d'un désavantage compétitif à capter suffisamment le BAFF (B-cell activation factor) qui est nécessaire à la maturation et à la survie des LB (87).

D'autre part, des LB régulateurs (Breg) ont été identifiés en 2002 lors de la découverte de LB producteurs d'IL-10 (94). Ces Breg sont plus difficiles à définir que les Treg car aucun marqueur

membranaire ou intra-cellulaire spécifique de ce sous-type de LB n'a été mis en évidence. D'autre part, bien que certaines équipes ont montré leur prédominance parmi les LB transitionnels, des LB dont la production cytokinique les caractérise comme des Breg peuvent être obtenus à partir de n'importe quel stade de développement des LB sous l'influence de l'engagement du BCR, des TLR et de cytokines variées (88,95). Ces Breg sont ainsi principalement définis par leur production cytokinique, au premier plan desquelles l'IL-10, mais aussi de TGFβ, d'IL-35 et de granzyme B. Grâce à cette production de cytokines anti-inflammatoires les Breg inhibent la prolifération des LT (96), modulent la polarisation des LT en inhibant leur différenciation en Th1 et Th17, favorisent le maintien des Treg, et répriment le profil pro-inflammatoire des DCs (88,97). D'autre part, les Breg diminuent aussi l'activation des DCs et des monocytes (88).

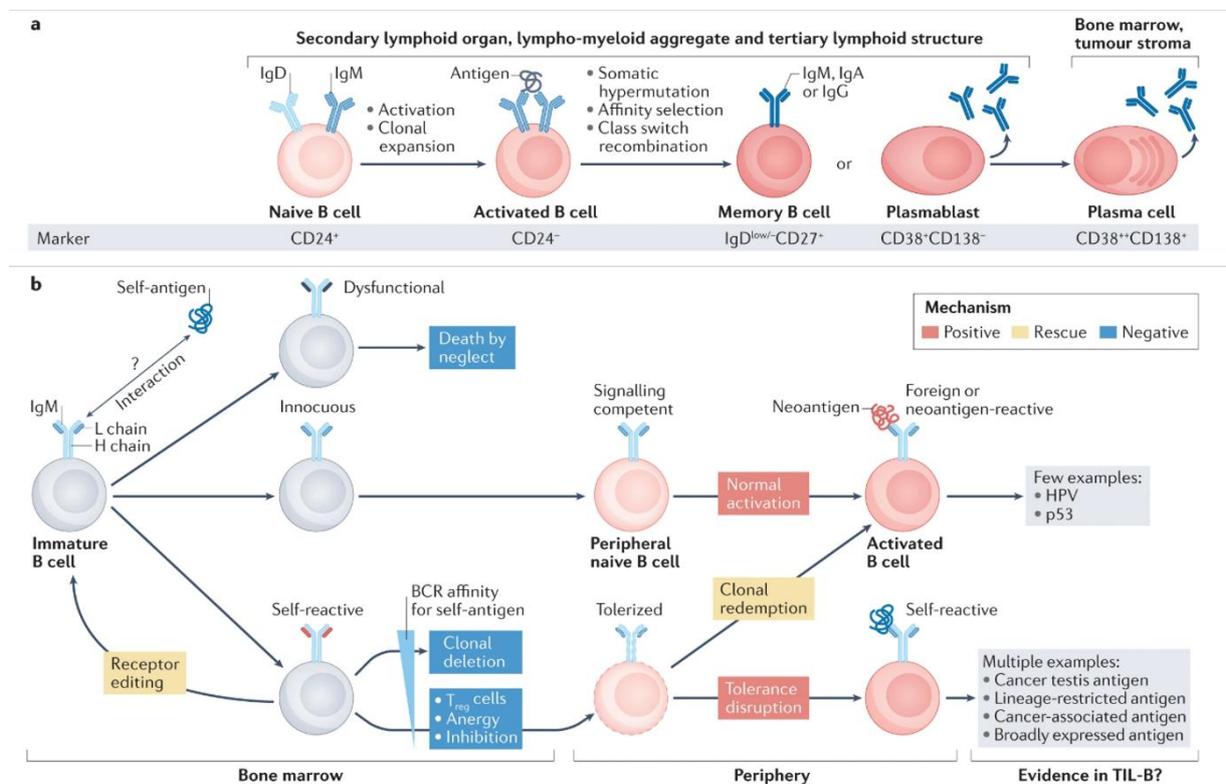


Figure 12. Tolérance centrale des lymphocytes B (adapté de Laumont et al, Nat Rev Cancer 2022 (88))

c. Rupture de tolérance

Ainsi, bien que les LT et les LB soient soumis à des processus de tolérance multiples, les mécanismes supportant leurs répertoires antigéniques différent, donnant des définitions du soi complémentaires et interdépendantes, ce qui a des implications importante pour l'auto-immunité. Ainsi, la rupture des mécanismes de tolérance périphérique, causée par une mutation génétique d'un des acteurs de cette tolérance ou par des contextes inflammatoires (néoplasie, infections aiguës ou chroniques), peut être à

l'origine de réponse immunitaire adaptative auto-réactive à même de déclencher une maladie auto-immune (88,98,99). Ainsi, en contexte tumoral ou infectieux, la levée du phénomène d'ignorance par rupture des barrières physiologiques et la destruction de cellules du soi peuvent être à l'origine du relargage d'auto-antigènes dans les tissus, pouvant entraîner une activation de cellules auto-réactives anergiques (88,99). D'autre part, les infections virales ou bactériennes peuvent relarguer des antigènes proches des antigènes du soi. Ce mimétisme antigénique peut être responsable de l'activation de LT et de LT anergiques et entraîner une maladie auto-immune (99). Un apport persistants dans le temps d'auto-antigène amplifiera alors la réponse auto-immune qui se perpétuera, conduisant à l'activation des différents intervenants participant à la défense immunitaire. Des modifications nombreuses des différents intervenant de l'immunité innée et adaptative ont ainsi été mises en évidence dans les maladies auto-immunes ou inflammatoires, avec une fréquente prépondérance d'acteurs lié à l'activation des Th1, des Th2 ou des Th17. Les modification constatées lors du pemphigus sont traitées plus loin.

C. LES DIFFERENTES MALADIES BULLEUSES AUTO-IMMUNES

Les MBAI constituent un groupe hétérogène de maladies auto-immunes ayant pour caractéristique commune le développement de bulles et d'érosions cutanées et/ou muqueuses suite à la perte d'adhérence des kératinocytes au sein de l'épithélium ou au niveau de la jonction dermo-épidermique/chorio-épithéliale. Les MBAI peuvent être séparées en 2 groupes principaux en fonction de la zone de clivage, les MBAI intra-épidermiques (groupe des pemphigus) et les MBAI de la jonction dermo-épidermique (groupe des pemphigoïdes) []. Les principales MBAI sont présentées dans la **figure 9**.

Les MBAI intra-épidermiques/intra-épithéliales comprennent les pemphigus, dont le nom dérive du grec « pemphix » qui signifie bulle. Les MBAI de la jonction dermo-épidermique constitue un groupe hétérogène de maladies. Certaines présentent une atteinte cutanée prédominante (pemphigoïde bulleuse, pemphigoïde de la grossesse, dermatite herpétiforme). Les autres MBAI de la jonction sont la pemphigoïde cicatricielle cutanée isolée, épidermolyse bulleuse acquise, dermatose à IgA linéaire, lichen plan pemphigoïde et le lupus bulleux. Du fait des avis d'experts internationaux et conformément aux recommandations internationales récentes, ces dernières sont regroupées sous le terme de pemphigoïde des muqueuses en cas d'atteinte muqueuse prédominante (**Fig. 13**) (2,100).

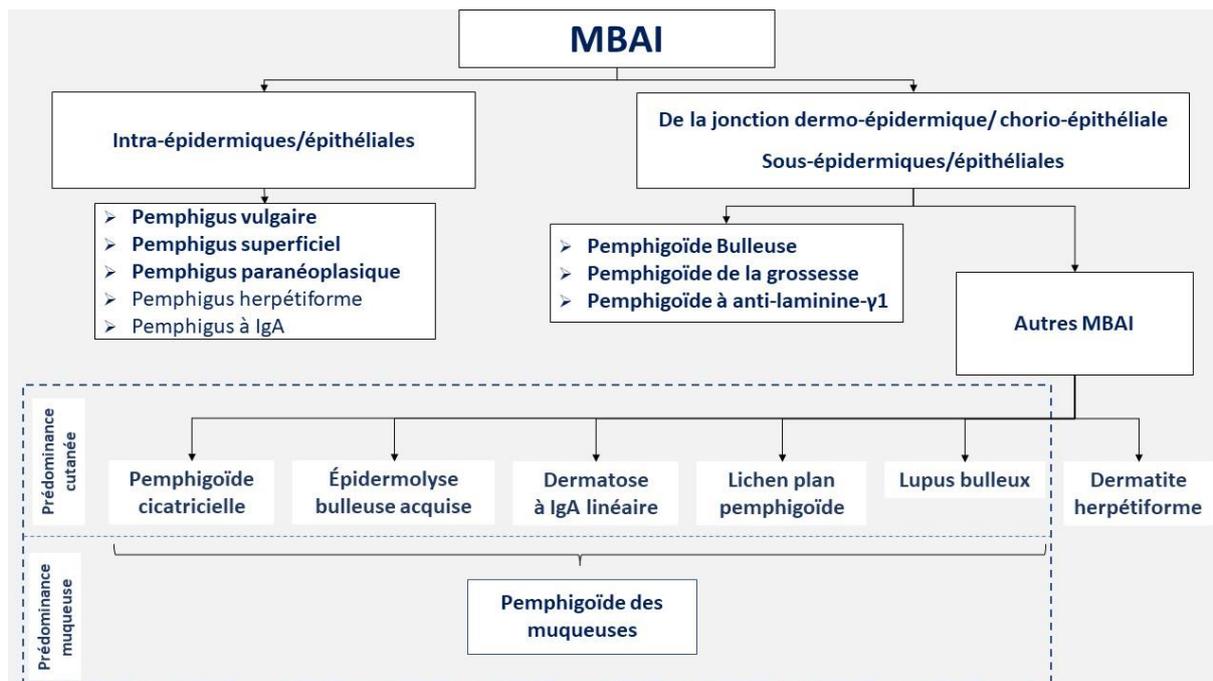


Figure 13. Les différentes maladies bulleuses auto-immunes

Les auto-anticorps mis en évidence dans les sérums des patients atteints de MBAI ciblent de nombreux antigènes de ces systèmes de jonction. Dans chaque sous-type de MBAI, une ou plusieurs protéines de desmosomes, hémidesmosomes ou de la JDE/JCE sont la cibles d'auto-anticorps ; cette différence de cible antigénique participe à expliquer les différences sémiologiques observées dans ces maladies du fait de la zone où survient le perte d'adhérence de l'épithélium et du clivage (**Fig. 14**).

L'examen clinique permet de suspecter une MBAI devant la présence de lésions actives (bulles, vésicules, érosions, squames, croûtes) touchant la peau et ou les muqueuses (**Fig. 14**). Le caractère tendu ou flasque des bulles et leur répartition permet de suspecter une MBAI du groupe des pemphigus (bulles flasques, fugaces, érosions, squames-croûtes) ou une MBAI du groupe des pemphigoïdes (bulles tendues sur peau inflammatoire) (**Fig. 14**). La répartition des zones atteintes de la peau ou de la muqueuse buccale et la présence de particularités sémiologiques permet souvent de suspecter le sous-type de MBAI. Ainsi, l'apparition d'un décollement cutané en peau saine suite à la friction au doigt (signe de Nikolsky) permet d'orienter vers un pemphigus ; la présence de cicatrices cutanées et de grains de milium oriente vers une MBAI sous-épidermique (pemphigoïde cicatricielle cutanée isolée, épidermolyse bulleuse acquise, pemphigoïde des muqueuses).

Le diagnostic de maladie bulleuse est confirmé par la mise en évidence d'un clivage intra-épidermique/épithélial ou sous-épidermique/épithélial à l'examen histologique (**Fig. 14**). La confirmation de l'origine auto-immune de la maladie bulleuse est obtenue par la mise en évidence d'un dépôts d'immunoglobulines (IgG, IgA, IgM) et/ou de complément (C3) en IFD ; avec un dépôt en résille pour les MBAI intra-épithéliales ou linéaire à la jonction pour les MBAI jonctionnelles (**Fig. 14**). Le diagnostic du sous-type de MBAI nécessite la mise en évidence d'auto-anticorps ciblant une ou des

protéines des systèmes de jonction dans le sérum des patients par des techniques immunologiques variées (immunofluorescence indirecte sur peau ou œsophage de rat ou de singe, immunofluorescence indirecte sur peau clivée de singe ou humaine, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), bioship, immunoblot sur extrait de membrane amniotique ou sur protéine recombinante) (4,100,101). D'autres techniques comme la immunomicroscopie électronique permettent d'aider au diagnostic de MBAI et de son type en cas d'IFD et de recherche d'anticorps circulants négatifs (102). Les principales caractéristiques cliniques et immunologiques des MBAI sous-épithéliales sont exposées dans le tableau 2.

	PV	PF	PNP EP, PP, DP, plectine, epiplakine Dsg1, Dsg3 Dsc 1-3 BP180, BP230 A2ML1	BP BP180 BP230	DIGAL LAD-1 LABD-97 (fragment of BP180)	EBA Collagène Type VII	MMP BP180, BP230 Intégrine $\alpha 6\beta 4$ Collagène Type VII Lamine 332 LAD-1
Antigènes cibles	Dsg3 Dsg1	Dsg1 Dsc3					
Atteinte cutanée							
Atteinte muqueuse		Absence					
Histologie							
IFD							

Figure 14. Antigènes cibles, présentation clinique, zone de clivage en histologie et dépôt d'auto-anticorps en IFD des principales maladies bulleuses auto-immunes.

Notes: les images proviennent de patient du service de Dermatologie de l'Hôpital Avicenne (AP-HP, Bobigny, France) excepté l'image d'immunofluorescence directe de pemphigus paraneoplasique (Proot AM et al. British Journal of Dermatology; 2016).

Abréviations : PV, pemphigus vulgaire ; PF, pemphigus foliacé ; PNP, pemphigus paraneoplasique ; DIGAL, dermatose à IgA linéaire ; EBA, épidermolyse bulleuse acquise ; MMP, pemphigoïde des muqueuses ; IFD, immunofluorescence directe.

MBAI	Manifestations cliniques	Auto-anticorps
Pemphigoïde bulleuse Pemphigoïde de la grossesse	Bulles tendues Nappes/plaques pseudo-urticariennes Prurit intense Pas de cicatrices.	IgG/IgE anti-BP180 IgG/IgE anti-BP230
Pemphigoïde à anti-laminine-γ1	Bulles tendues Nappes/plaques pseudo-urticariennes Prurit intense	IgG anti-laminine-γ1
Pemphigoïde cicatricielle cutanée isolée	Bulles tendues en peau saine ou pseudo-urticarienne. Evolution cicatricielle	IgG/IgE anti-BP180
Pemphigoïde des muqueuses	Atteinte muqueuse prédominante (érosions) Atteinte cutanée non prédominante (bulles tendus, +/- sur base inflammatoire) Evolution cicatricielle	IgG/IgA/IgE anti-BP180 IgG/IgA anti-BP230 IgG anti-intégrine α6β4 IgG anti-laminine 332 IgA anti-LAD-1 IgG/IgA anti-collagène type VII
Epidermolyse bulleuse acquise	Fragilité cutanée Bulles en zone non érythémateuse, prédominant sur les zones de frottement Evolution cicatricielle	IgG/IgA anti-collagène type VII
Dermatose à IgA linéaire	Bulles tendues en peau saine ou pseudo-urticarienne Lésions en rosette	IgA anti-LAD 1 IgA anti-BP180
Lichen plan pemphigoïde	Bulles/érosions sur une zone de lichen plan	IgA anti-BP180
Dermatite herpétiforme	Vésicules sur zones saines ou érythémateuses Lésions de grattage/prurit intense	IgA anti-transglutaminase

Tableau 4. Principales manifestations cliniques et auto-anticorps associées aux MBAI sous-épidermiques

Les MBAI sont rares mais ont une morbi-mortalité importante en absence de traitement. Obtenir une rémission complète rapide afin de réduire cette morbi-mortalité est donc un objectif primordial. Celle-ci était antérieurement obtenue uniquement grâce à l'utilisation d'immunosuppresseurs conventionnels dont l'utilisation chronique afin de prévenir ou de traiter des rechutes était responsable d'effets indésirables bien connus. L'évolution des connaissances des perturbations immunologiques présentes chez la patients atteint de MBAI a permis le développement de thérapeutiques ciblées qui ont changé le paysage thérapeutique des MBAI et le pronostic des patients. Au premier rang de ces thérapeutiques figure les anticorps monoclonaux anti-CD20 (rituximab), qui par son action de déplétion des LB responsables de la production des auto-anticorps pathogènes a démontré une efficacité importante dans le pemphigus et dans certaines MBAI sous-épidermiques. Cependant, certains patients ne répondent pas à ces nouvelles thérapeutiques ou rechutent à distance des traitements ce qui nécessite parfois des traitements séquentiels au long cours. Ainsi, la poursuite de la recherche sur les mécanismes responsables de la dérégulation immunitaire dans les MBAI demeure essentielle afin d'identifier les facteurs impliqués dans l'activité, dans la rechute et dans la rémission de la maladie de ces patients, afin d'aboutir à la découverte de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Au sein du laboratoire UMR1125, notre équipe de recherche travaille sur l'auto-immunité médiée par les LB dans les MBAI et sur leur traitement. Notre équipe travaille en association avec le service de dermatologie de l'hôpital Avicenne (AP-HP, Bobigny, France) qui participe au centre de référence national sur les MBAI. Dans ce manuscrit figurent les résultats de notre travail de recherche mené en coopération avec le Dr Baptiste Janela (Skin Research Institute of Singapore, Singapore) sur le couple CD83 membranaire exprimé par les LB / CD83 soluble chez les patients atteints de pemphigus. D'autre part j'ai participé au cours de cette thèse à l'écriture d'articles de revue sur le pemphigus et d'articles de recherche translationnelle/thérapeutique sur la pemphigoïde bulleuse et sur les pemphigoïde des muqueuses qui figurent en Annexes de ce manuscrit.

- **Annexe I** (Lim Y, Bohelay G, Hankawa S, Musette P, Janela B et al. **Autoimmune pemphigus, latest advances and emerging therapies. *Front mol Biosc.* 2022)**
- **Annexe II** (Bohelay G, Caux F, Musette P. **Clinical and biological activity of rituximab in the treatment of pemphigus. *Immunotherapy.* 2021)**
- **Annexe III** (Yatim A*, Bohelay G*, Grootenboer-Mignot S, Prost-Squarcioni C, Alexandre M, Le Roux-Villet C, Martin A, Maubec E, Caux F. **Paraneoplastic Pemphigus Revealed by Anti-programmed Death-1 Pembrolizumab Therapy for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Complicating Hidradenitis Suppurativa. *Front Med (Lausanne).* 2019)**
- **Annexe IV** (Bohelay G*, Alexandre M*, Le Roux-Villet C, Sitbon I, Doan S, Soued I, Shourick J, Rousset L, Mellottee B, Heller M, Lièvre N, Zumelzu C, Morin F, Grootenboer-Mignot S, Gabison E, Caux F, Prost-Squarcioni C, Musette P. **Rituximab therapy for mucous membrane pemphigoid: a retrospective monocentric study with long-term follow-up in 109 patients. *Front immunol.* 2022)**
- **Annexe V** (Alexandre M*, Bohelay G*, Gille T, Le Roux-Villet C, Soued I, Morin F, Caux F, Grootenboer-Mignot S, Prost-Squarcioni C. **Rapid disease control in first-line therapy-resistant mucous membrane pemphigoid and bullous pemphigoid with omalizumab as add-on therapy: a case series of 13 patients. *Front immunol.* 2022)**

D. LE GROUPE DES PEMPHIGUS

Le diagnostic de MBI intraépithéliale est évoqué par la présence de vésicules/bulles, d'érosions ou d'éruption squamo-croûteuse au plan cutané et devant des érosions récurrentes des muqueuses (3). Le diagnostic est confirmé par la mise évidence d'un clivage intra-épidermique à l'examen histologique sur une biopsie réalisée en bordure d'une érosion et d'un dépôt inter-kératinocytaire en IFD sur une biopsie réalisée en peau intacte péri-lésionnelle (101). La présence d'auto-anticorps sériques constitue une aide diagnostique importante dans les cas rares où la biopsie est impossible ou quand l'IFD est non-informative ; notamment chez certaines patients déjà sous immunosuppresseurs. En routine, les anticorps anti-substance intercellulaire sont recherchés par immunofluorescence indirecte (IFI) sur œsophage singe (101). L'antigène ou les antigènes ciblés par ces auto-anticorps sériques sont recherchés en routine par ELISA (Desmogléine 1 et 3, envoplakine) et par immunoblot sur extrait de membrane amniotique ou sur protéine recombinante pour les autres (101).

1. Manifestations cliniques et critères diagnostiques des variants de pemphigus

Tous les patients souffrant de pemphigus présentent des auto-anticorps dirigés contre des protéines desmosomales ; cependant chaque variant a ses propres caractéristiques cliniques, histologiques et immunologiques (101). La reconnaissance de ces caractéristiques cliniques et immunologiques est nécessaire au diagnostic rapide et correct du type de pemphigus permettant de débiter au plus tôt la thérapeutique la plus adaptée (101). L'amélioration des connaissances des spécificités immunologiques de chaque sous-type est un enjeu important car elle pourrait permettre l'émergence de stratégies thérapeutiques spécifiques à chaque variant prenant en compte les différences de comorbidités des populations atteintes. Les principales formes de pemphigus sont le pemphigus vulgaire et le pemphigus superficiel ; les autres formes, pemphigus paranéoplasique, pemphigus herpétiforme, pemphigus à IgA, pemphigus végétant et pemphigus érythémateux étant plus rares (101).

a. Pemphigus vulgaire

Le pemphigus vulgaire (PV) tient sa dénomination du latin « vulgus » qui signifie commun. En effet, le pemphigus vulgaire représente jusqu'à 70% des cas de pemphigus des séries épidémiologiques publiées (103,104) avec une incidence estimée à 1-5 cas/million d'habitant/an (104,105). Cette incidence varie cependant grandement en fonction des régions du monde et des ethnies étudiées. Alors que des incidences de 0,5 à 0.76 cas/million d'habitant sont rapportées en Allemagne et en Finlande respectivement, l'incidence du PV a été rapportée comme vingt fois supérieure aux Etats Unis d'Amérique et en Israël (106,107).

Le PV atteint typiquement des adultes âgés de 45 à 65 ans avec une légère prédominance féminine (103,108). L'incidence du PV augmente avec l'âge et les cas de PV chez l'enfant sont rares.

Les patients atteints de PV présentent des lésions muqueuses ou cutanéomuqueuses (**Fig. 15**). Dans la moitié des cas, la première zone atteinte est la cavité buccale avec des atteintes des gencives (attachée plus qu'alvéolaire), des lèvres au versant muqueux, du palais, du plancher buccal et de la face interne des joues, et de la langue (**Fig. 15A-E**) (109,110). Les autres muqueuses malpighiennes peuvent être atteintes : nasale, pharyngée, laryngée, génitale (gland et vulve, **Fig. 15J**), anale, conjonctivale (**Fig. 15F**) et œsophagienne (110). L'atteinte muqueuse est responsable de symptômes d'intensité variée allant de l'inconfort à des douleurs sévères pouvant être responsables de difficultés lors de la prise alimentaire entraînant une perte de poids et une dénutrition.

Chez les patients présentant des lésions cutanées, les lésions actives (bulles flasques en peau saine, larges érosions) prédominent sur les zones séborrhéiques du corps et sur les zones exposées à un stress mécanique. Les lésions siègent ainsi le plus souvent sur le cuir chevelu, le visage, le tronc et dans les plis (**Fig. 15G-I**). L'apparition d'un décollement ou d'une érosion peut être provoquée par l'application d'une pression tangentielle en peau péri lésionnelle non atteinte, constituant le signe de Nikolsky ; signe cependant non pathognomonique pouvant aussi être mis en évidence dans les dermatoses acantholytiques d'origine génétique ou certaines toxidermies. Des lésions des extrémités des membres sont souvent constatées et l'atteinte péri-unguéale peut être responsable d'un aspect de pseudo panaris pouvant aboutir à des déformations unguéales (**Fig. 15K**) (111). Après guérison, les lésions de pemphigus guérissent sans laisser de cicatrice au contraire de certaines MBI sous-épithéliales mais peuvent être responsables de séquelles hypochromiques ou hyperchromiques pouvant persister plusieurs mois chez les patients de phototypes foncés (112).

Dans le pemphigus vulgaire, l'acantholyse et le clivage intra-épidermique apparaissent à la partie suprabasale de l'épithélium (**Figure 14**). L'IFD met en évidence un dépôt inter-kératinocytaire d'IgG et/ou de C3 en résille intra-épidermique sur toute la hauteur de l'épithélium ou prédominant à la zone basale (101). Des anticorps anti-Dsg sont mis en évidence dans 95% des sérum des patients et le taux circulant d'anticorps anti-Dsg est corrélé à l'activité clinique de la maladie (101). Les anticorps anti-Dsg3 sont plus fréquemment positifs que les anticorps anti-Dsg1 ; souvent isolés en cas d'atteinte limitée aux muqueuses ou associés à la présence d'anticorps anti-Dsg1 chez les patients présentant une atteinte cutanéomuqueuse (101).

Des formes PV néonatal, responsables de manifestations cliniques transitoires (vésicules, érosions, exfoliation cutanée), sont décrites chez les nouveau-nés de mères atteintes de PV en lien avec le transfert transplacentaire d'auto-anticorps maternels (113,114). Les manifestations cliniques s'amendent spontanément en quelques semaines après disparition des auto-anticorps maternels circulants.

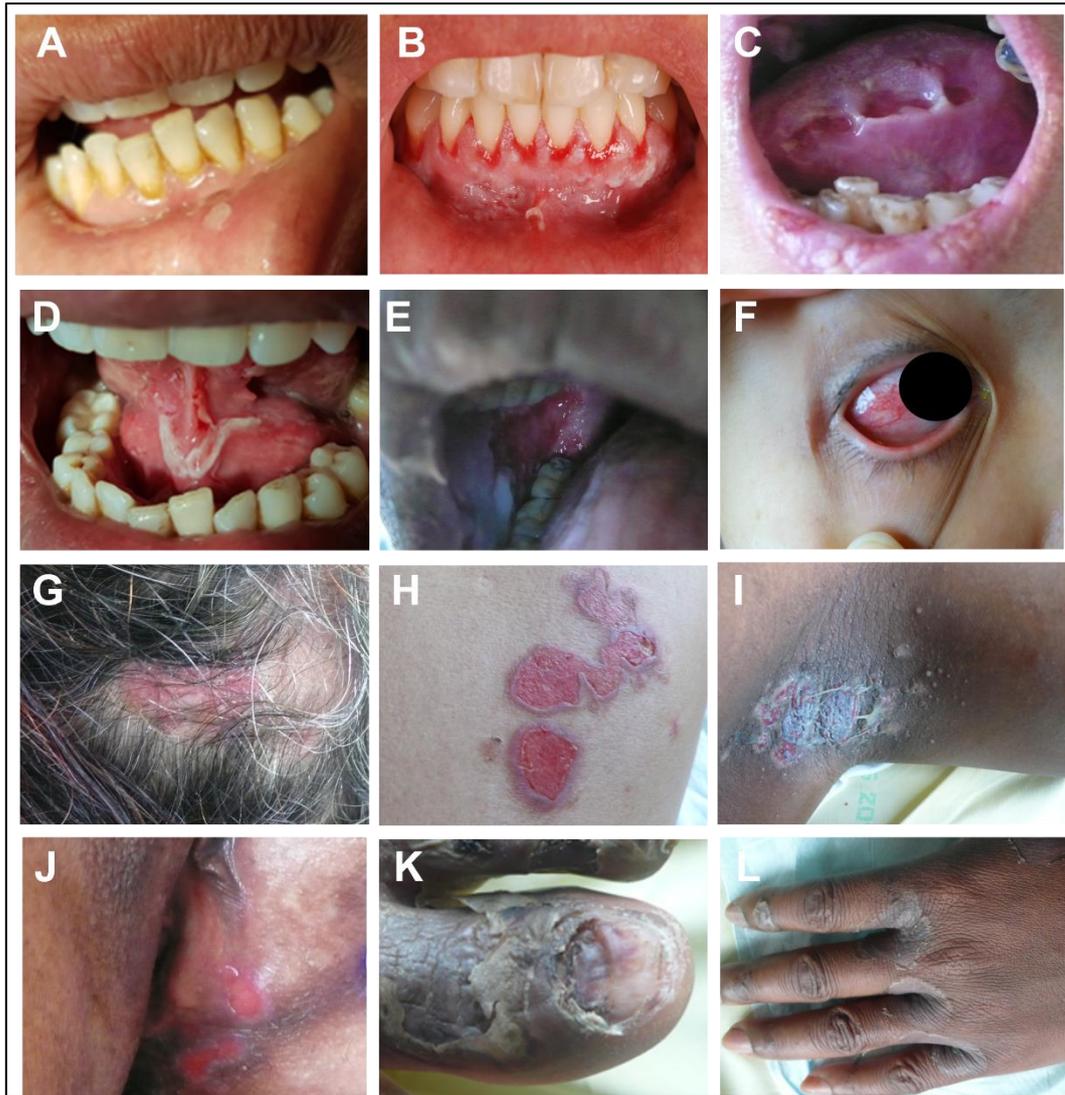


Figure 15. Manifestations cliniques du pemphigus vulgaire.

Vésicule de la lèvre inférieure (A), érosions de la gencive alvéolaire et attachée (B), de la langue (C), du plancher buccal (D), de la face interne des joues ; épisclérite (F) ; érosions cutanées prédominant sur les zones séborrhéiques : cuir chevelu (G), dos (H), creux axillaires (I) ; érosions vulvaires (J) ; séquelles à type d'onychodystrophie (K) et de pigmentation cutanée post inflammatoire (L). Note : les images 5B et 5F proviennent de la référence Yatim et al, Front Med, 2019 (Annexe I)

b. Pemphigus superficiel

Le pemphigus superficiel (PS), ou pemphigus foliacé (dérivé de *folium*, *i.e.* feuille en latin) est le deuxième type de pemphigus le plus commun (115). Sa fréquence est estimée à 27% des cas incidents de pemphigus en France (104). Le PS affecte des patients d'âge plus variable compte tenu des spécificités des certains sous-variants de PS. Dans le PS, les muqueuses sont épargnées et l'acantholyse se produit sous la couche cornée de l'épiderme menant à des vésicules/bulles très superficielles et fugaces ; le plus souvent, les lésions prédominantes sont des nappes érythémateuses, finement érosives ou couvertes de squames ou de croûtes (103). Ces lésions prédominent sur les zones séborrhéiques à

l'extrémité céphalique et aux zones médianes du thorax (**Fig. 16A-D**). Dans les formes sévères, le PS peut se présenter sous la forme d'une érythrodermie (atteinte chronique de plus de 90% de la surface corporelle). L'examen histologique d'une biopsie cutanée en zone lésionnelle met en évidence une acantholyse, un clivage ou des fentes sous-cornées au niveau de la couche granuleuse, et des vésicules ou pustules sous cornées. L'IFD met en évidence un dépôt inter-kératinocytaire d'IgG et parfois de C3 en résille prédominant dans les couche superficielle de l'épiderme (101). Comme dans les autres formes de pemphigus, des anticorps anti-substance intercellulaire sont mis en évidence en IFI ; en ELISA, seuls des anticorps anti-Dsg1 sont mis en évidence, ce qui explique l'absence d'atteinte muqueuse selon la théorie de compensation de l'expression de Dsg1/Dsg3 dans les épithéliums (116).

Plusieurs sous-variants de PS ont été décrits. Notamment, une forme modérée limitée ou débutant sur les zones malaires, proche des lésions de vesperilio décrites dans le lupus érythémateux systémique (LES), est dénommée sous le terme de pemphigus érythémateux (ou syndrome de Senear-Usher) (117,118). Ces patients présentent des anticorps anti-nucléaires circulantes dans 30 à 80% des cas, sans que leur pathogénicité soit prouvée dans le pemphigus érythémateux, et une bande lupique d'IgG et de C3 à la jonction dermo-épidermique (119,120). D'autre part, trois sous-variants restreints à des zones géographiques ou à des populations ont été décrits. Le premier de ces sous-variant endémiques est le fogo selvagem, décrit depuis 1903 dans certaines zones subtropicales du Brésil et où sa prévalence pourrait atteindre 3 à 5% des habitants (115,121). Alors que le PS est rare chez les enfants (122), jusqu'à 30% des patients atteints de fogo selvagem sont des enfants ou des jeunes adultes (121). Le deuxième sous-variant, le PS colombien est proche du fogo selvagem mais prédominerait chez l'homme (123,124) []. Le troisième sous-variant de PS endémique, décrit dans les pays d'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc) et d'Afrique sub-Saharienne (Mali) (125,126), prédomine chez les femmes jeunes de 25 à 35 ans avec une prédominance de série de cas familiaux (125,127). Par leurs caractéristiques épidémiologiques et cliniques, ces sous variants questionnent les facteurs déclenchant du pemphigus et ont permis de suggérer certains mécanismes impliqués dans sa survenue.

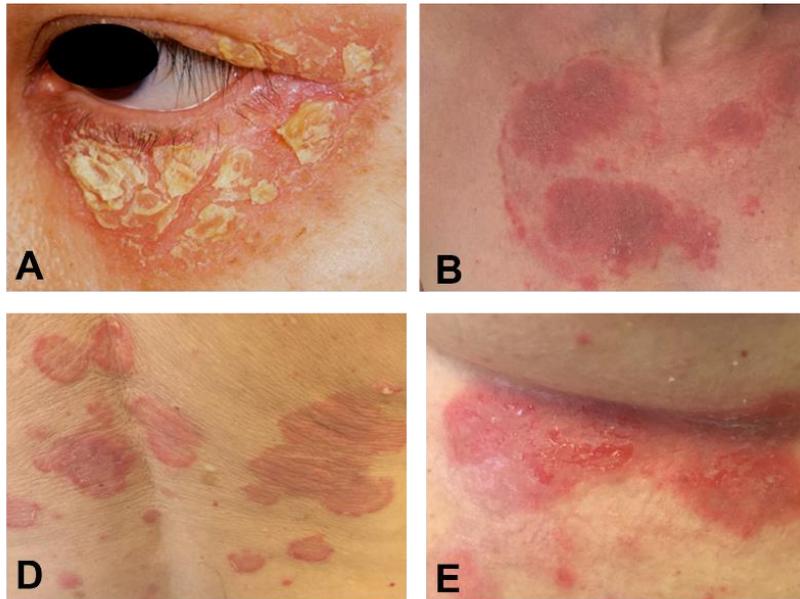


Figure 16. Manifestations clinique du pemphigus superficiel.

Plaques érythémato-squameuses avec squames épaisses palpébrales (A), avec squames fines des zones séborrhéiques du décolleté (B) et du dos (C) chez des patients ayant un pemphigus superficiel ; plaque érythémateuse avec érosions superficielles du pli sous mammaire (D) chez une patiente ayant un pemphigus superficiel.

c. Pemphigus paranéoplasique

Le pemphigus paranéoplasique (PPN) représente environ 5% des cas incidents de pemphigus (128). Le PPN est presque exclusivement décrit chez des patients présentant une néoplasie connue ou occulte ; en particulier des hémopathies lymphoïdes (maladie de Castelman, lymphome non-hodgkinien, leucémie lymphoïde chronique) et plus rarement des carcinomes et des sarcomes (129–133). Ainsi, le PPN est le plus souvent décrit chez des adultes de 45 à 70 ans (133). Le PPN se présente sous forme de lésions cutané-muqueuses comme le PV. Bien que toutes les muqueuses puissent être atteintes, le PNP est souvent responsable d'une atteinte buccale sévère avec une chéilite érosive ou nécrotique évocatrice par sa sévérité et par une atteinte débordant la bordure du vermillon (**Fig. 17A-B**) (129). Le PPN se démarque des autres formes de pemphigus par le polymorphisme des lésions cutanées observées pouvant associer des érosions et des bulles flasques habituelles dans le pemphigus mais aussi des bulles tendues en peau saine ou inflammatoire (**Fig. 17D-E**), des lésions pustuleuses ou à type d'érythème polymorphe, et des lésions lichénoïdes (**Fig. 17F**) (129,130,133). Le PPN peut être responsable d'atteintes extra-cutanées, notamment pulmonaires et plus rarement gastro-intestinales, qui associées à la profusion des lésions cutané-muqueuses et à une néoplasie sous-jacente contribuent à une mortalité importante (130).

Ce polymorphisme clinique est sous-tendu par des particularités histologiques et immunologiques. Histologiquement, le PPN démontre des signe d'acantholyse suprabasale et une dermite lichénoïde d'interface associée à une exocytose épidermique et à des nécroses kératinocytaires éparses causée par

des LT CD4+ et CD8+ autoréactifs (132). En IFD, en plus du marquage inter-kératinocytaire en résille, un dépôt linéaire d'IgG/C3 à la jonction peut être mis en évidence (**Fig. 14**), expliquant la présence de bulles tendues (**Fig. 17D**). Dans les sérums des patients atteints de PPN, des auto-anticorps dirigés contre une ou plusieurs protéines desmosomales (desmogléines, desmoplakines, épiplakine envoplakine, périplakine, desmocollines) ou hémi-desmosomales (BP180, BP230) sont mis en évidence (134–141). La découverte d'anticorps anti-envoplakine, périplakine, épiplakine, desmoplakine et A2ML-1 en ELISA ou immunoblot supporte le diagnostic du PPN (101). Dans le cas du PPN, l'émergence de la maladie pourrait être causée par l'apparition d'anticorps contre des antigènes tumoraux qui entraîneraient une réaction croisée contre les antigènes des protéines desmosomales et hémi-desmosomales des épithéliums malpighiens. Ce processus de réaction croisée est aussi suspecté pour certains antigènes environnementaux dans le cadre du PS endémique.

d. Autres formes de pemphigus

Le pemphigus végétant est un variant rare de pemphigus, représentant 1 à 2% des cas incidents de pemphigus (142). Le pemphigus végétant est caractérisé par des plaques végétantes hypertrophiques papillomateuses atteignant principalement les plis, la région ano-génitale et le cuir chevelu (**Fig. 17G**) (143,144). Deux types sont décrits en fonction de l'aspect initial des lésions et de l'évolution clinique : le type Neumann et le type Hallopeau. Le type Neumann se présente sous la forme de vésicules flasques et d'érosions, évoluant vers des plaques papillomateuses hypertrophiques, blanchâtres, à l'odeur fétide, touchant les plis, les lèvres, et plus rarement le tronc et les extrémités ; la muqueuse buccale est généralement atteinte (145). Le type Hallopeau est responsable des lésions pustuleuses localisées qui se rompent et coalescent en érosions végétatives, sans atteinte de la muqueuse buccale. Les auto-anticorps mis en évidence dans le pemphigus végétant sont dirigés contre les Dsg1 et Dsg3 ou d'autres protéines constituant les desmosomes (143,146).

Le pemphigus à IgA, encore plus rare, se caractérise cliniquement par des plaques érosives/croûteuses, annulaires bordées de vésicules/pustules qui prédominent au tronc, à la partie proximale des extrémités et des régions intertrigineuses (**Fig. 17H**) ; l'atteinte muqueuse est rare (147). En histologie, l'acantholyse est généralement absente et des pustules sont mises en évidence ; l'IFD montre un dépôt inter-kératinocytaire d'IgA (148). En fonction de la localisation des pustules dans l'épiderme et de la cible antigénique reconnue par les auto-anticorps, on distingue deux formes de pemphigus à IgA ; la pustulose sous-cornée où les pustules se forment dans la partie superficielle de l'épiderme et où les IgA auto-réactives sont dirigés contre la Dsc1, et la dermatose neutrophilique intra-épidermique qui se caractérise par des pustules suprabasales associées à la présence d'anticorps IgA contre les Dsg1 ou les Dsg3 (148). Certains patients présentant des pemphigus à IgA peuvent présenter des gammopathies à IgA et des colites ulcéreuses (148).

Le pemphigus hérpétiforme est un sous-type rare de pemphigus, cliniquement proche de la dermatite hérpétiforme, responsable de lésions prurigineuses (vésicules, plaques annulaires pseudo-urticariennes (**Fig. 17I**), nappes érosives ou placards eczématiformes) (149). L'examen histologique est moins spécifique que dans le PV, mettant en évidence une spongiose à éosinophiles ou à neutrophiles, des vésicules intra-épidermiques contenant des neutrophiles et éosinophiles, ainsi que des micro-abcès des papilles dermiques (150). Les résultats d'IFD et des explorations immunologiques sériques sont proches de ceux observés dans le PV (151,152).

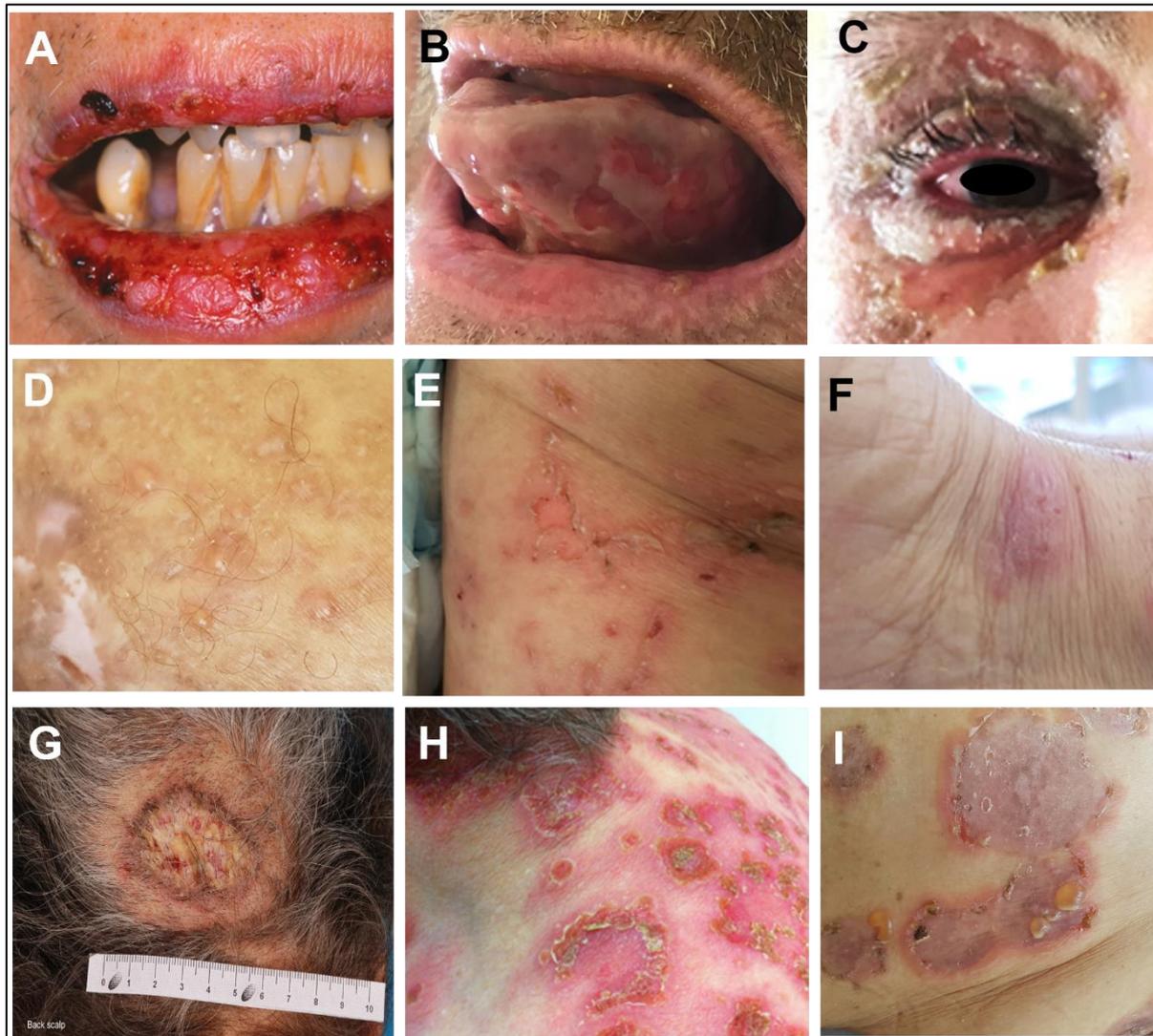


Figure 17. Manifestations cliniques des autres formes de pemphigus.

*Chéilite érosive (A), stomatite sévère avec érosions de la langue (B), conjonctivite pseudomembraneuse avec érosions palpébrales (C), vésicules tendues en peau saine (D), érosions et vésicules en peau inflammatoire (E), lésions d'allure lichéniennes (F) chez des patients atteints de **pemphigus paranéoplasiques**. Plaque végétante du cuir chevelu occipital chez un patient atteint de **pemphigus végétant** (H). Croûtes de disposition arrondie ou annulaire du tronc et du cou chez un patient atteint d'un **pemphigus à IgA** (I). Nappes érythémato-squameuses à bordure vésiculo-bulleuse annulaire chez un patient avec un **pemphigus hérpétiforme** (J).*

2. Facteurs de risque associés au pemphigus

Les maladies auto-immunes, dont le pemphigus, ont une étiologie complexe ; les mécanismes immunologiques menant à leur apparition restent pour une grande part à préciser. Des facteurs (génétiques, environnementaux, pathologies préexistantes, traitements reçus, réactions post-vaccinales) ont cependant été associés à l'émergence du pemphigus.

a. Facteurs de risque génétiques

Le regroupement de cas familiaux de certains variants de pemphigus, la surreprésentation de pemphigus dans certaines ethnies et la cooccurrence du pemphigus et d'autres maladies auto-immunes suggère une susceptibilité génétique importante dans le pemphigus. L'association la plus forte est celle entre le PV et les gènes HLA de classe II (153). Des études ont montré que les allèles HLA DRB1*04:02 et DQB1*05:03 sont ceux le plus fréquemment associés au PV (154–157) ; la majorité des patients atteints de PV exprimant l'un de ces deux allèles. Si certains types HLA sont spécifiques d'une seule population, d'autres sont retrouvés associés au PV dans plusieurs ethnies ; un lien entre HLA-DRB1*04:02 et DQB1*03:02 avec la PV dans la population juive a été mis en évidence (158), tandis que HLA-DQB1*05:03 a été trouvé en association avec le PV dans des populations non juives (154). Des études menées chez des patients chinois Han atteints de PV ont mis en évidence une association avec les allèles HLA-DRB1*04, DRB1*14 et DQB1*05:03 (159), et avec le HLA-DRB1*03 et HLA-CW*14 dans la même population chinoise en cas de PPN (160,161). Des méta-analyses de la corrélation entre la survenue de PV et les allèles des HLA-DRB1 et -DQB1 ont montré que DQB1*05:03 et DRB1*04, DRB1*08, DRB1*14, DQB1*03:02 sont des facteurs de susceptibilité significatifs d'être atteint d'un PV (162,163). De plus, il pourrait exister une association entre PV et certains allèles HLA de classe I au sein de groupes ethniques spécifiques ; HLA-A10 et -B15 dans la population japonaise (164,165); HLA-A3, -A26 et -B60 dans la population chinoise Han (159). Bien que des différences de présentation antigéniques dépendantes du HLA soient suspectées, le lien mécanistique entre le profil HLA et le développement de l'un ou l'autre variant de pemphigus reste à élucider.

D'autres recherches ont mis en évidence l'association du PV avec certaines séquences d'autoantigènes ou de gènes. Des haplotypes de Dsg3 ont été associés de manière significative au PV dans des cohortes britanniques et indiennes (166). Des polymorphismes d'un seul nucléotide (Single Nucleotide polymorphisms, SNP) dans la région variable du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline VH3 ont été associés au PS (167). Des variants de gènes codant certaines cytokines (TNF- α , IL-6 et IL-10) ou codant des protéines impliquées dans l'assemblage et le transport des peptides vers les HLA de classe I ont été mis en évidence chez les patients atteints de PV (168). Des SNP des gènes, ST18 qui code pour un facteur de transcription impliqué dans l'inflammation et l'apoptose, CTLA4 et CD86 qui codent des protéines exprimées sur les CPA et participent à l'activation des LT et

à la stimulation de la production d'IgG par les LB, ont été associés à un surrisque de pemphigus (168–170).

Malgré l'existence d'associations significatives entre pemphigus et certains HLA, la majorité des individus porteurs de ces allèles de susceptibilité ne développent pas de pemphigus. Un groupe de chercheurs a démontré en comparant les gènes différentiellement exprimés de malades et de patients sains, tous deux porteurs d'HLA à risque, qu'un groupe de gènes était inversement exprimé dans les deux groupes, suggérant ce groupe de gène comme une signature de protection au développement du PV chez les individus sains (171).

b. Facteurs de risque environnementaux

L'environnement est un mélange complexe de facteurs auxquels sont soumis les individus dans le temps et l'espace, et qui interagit avec la susceptibilité génétique. Certains facteurs environnementaux ont été associés au développement du pemphigus, notamment dans certaines populations spécifiques atteintes de sous variants.

Dans le cas du Fogo selvagem, les cas de pemphigus prédominent chez les adultes travaillant en plein air et vivant dans des conditions d'hygiène et de logement précaires proche de zones forestières adjacentes à des rivières et des ruisseaux, faisant suspecter une cause environnementale (121). Des recherches ont abouti à la découverte de la protéine salivaire LJM11 produite par une mouche des sables (*Lutzomyia longipalpis*) qui réagit de manière croisée avec les anticorps anti-Dsg1 (172,173). L'exposition répétée à la salive de ces mouches pourrait donc être à l'origine du développement d'anticorps anti-Dsg1 et en conséquence du pemphigus.

L'exposition aux rayonnements UV est aussi suspectée d'être un facteur de risque du fait de nombreuses séries décrivant l'apparition ou la rechute de pemphigus au cours du printemps ou de l'été (168). Bien que l'exposition aux UVB soit responsable du déclenchement d'une acantholyse et de dépôts immun inter-kératinocytaires chez les patients atteints de Fogo selvagem, la physiopathogénie responsable des poussées induites par les UV n'est pas élucidée (174).

D'autres facteurs de risque environnementaux ont été avancés dont les traumatismes, le stress et l'alimentation (168). Le tabagisme semble conférer un effet protecteur et favoriserait une rémission plus rapide (175); certains suggérant que l'interaction de la nicotine avec les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine des kératinocytes pourrait renforcer l'adhérence inter-kératinocytaires.

c. Traitements inducteurs

Des médicaments ont été signalés comme pouvant déclencher un pemphigus. Les trois principaux groupes de médicaments associés à l'apparition ou à l'exacerbation de pemphigus décrits sont: ceux du groupe thiol, ceux du groupe phénol et ceux non-thiol/ non-phénol. Les médicaments thiol, comportant

un groupe sulfhydryle dans leur structure chimique, constituent le groupe de médicaments (pénicillamine, captopril, bucillamine, piroxicam) le plus fréquemment rapporté comme inducteur de pemphigus (176). Il a été démontré que les substances thiol biologiques telles que la cystéine et le glutathion pouvaient induire l'acantholyse de cultures kératinocytaires ou de fragments de peau humaine en conditions expérimentales (177). Les médicaments comprenant un groupement thiol formeraient des disulfures de cystéine qui interfèreraient directement avec l'adhésion des Dsg ou indirectement par la modification des antigènes et la production d'auto-anticorps (178).

Des vaccins ont également été signalés comme pouvant déclencher ou exacerber le pemphigus. Parmi eux, on trouve les vaccins contre la grippe, l'hépatite B, la rage, le tétanos et plus récemment, les vaccins contre le SARS-COV2 (168). Les hypothèses avancées sont celles d'une auto-immunité résultant du mimétisme moléculaire entre l'antigène vaccinal et/ou ses adjuvants avec des auto-antigènes (179), ou d'une activation non spécifique de l'immunité innée favorisant l'activation des LT et LB autoréactifs antérieurement anergiques (180). Il faut noter que les infections par les pathogènes contre lesquels ces vaccins sont dirigés n'ont pas été signalées comme déclencheurs de pemphigus, ce qui rend moins probable le déclenchement par mimétisme antigénique supposé dans la première hypothèse (181).

L'activation non spécifique de l'immunité innée à l'origine d'un renforcement global de l'immunité adaptative médiée par les LT qui pourrait inclure des lymphocytes T autoréactifs déjà présent dans le cadre d'une maladie infraclinique est aussi avancée dans les cas d'autres MBAI induites par les anticorps monoclonaux anti-récepteur PD-1. Nous avons notamment rapporté récemment un cas sévère de PPN révélé par des poussées induites lors des injections d'anticorps monoclonaux anti-PD-1 (129).

3. Mécanismes immunologiques impliqués dans le pemphigus

Comme exposé plus haut, le pemphigus et ses variants sont des maladies auto-immunes rares, voire très rares, ce qui limite les possibilités d'obtenir de grands effectifs de patients pour les études cliniques et les volumes de prélèvements biologiques humains obtenables pour la réalisation d'expériences mécanistiques in vitro. Ainsi, de nombreuses percées sur la pathogénèse du pemphigus des quarante dernières années reposent sur l'utilisation de différents modèles murins de pemphigus qui ont contribué directement ou indirectement à la découverte des auto-antigènes cibles des auto-anticorps, de la pathogénicité de ces auto-anticorps, des LB et LT autoréactifs et de leur rôle dans la production d'auto-anticorps pathogènes.

a. Auto-anticorps

Après l'identification de Dsg1 et de Dsg3 comme principaux auto-antigènes cibles des auto-anticorps dans le pemphigus, de nombreuses études ont porté sur les Ig, acteurs clés de l'immunité humorale

médiée par les LB (116,134,146,182). Le premier modèle murin de pemphigus, utilisant un modèle de transfert passif dans lequel les IgG du sérum de patients atteints de PV étaient injectées à des souris nouveau-nées, avait permis de montrer que les IgG de sérums de PV étaient capables d'induire des bulles et des érosions, reproduisant les caractéristiques cliniques et histologiques du pemphigus (183). Il est maintenant établi que, parmi les isotypes d'IgG, les IgG4 sont les principaux isotypes pathogènes (184–186). Plus rarement, d'autres isotypes ont été démontré comme pathogéniques dans certains variants (187,188). Ces auto-anticorps sont produits par des LB autoréactifs, notamment à partir de LB mémoires activés spécifiques des Dsg montrant des signes de maturation d'affinité et de sélection clonale (189).

Bien que le titre d'auto-anticorps anti-Dsg soit corrélé à l'activité clinique du pemphigus (190,191), des anticorps IgG anti-Dsg3 peuvent cependant être retrouvés chez des patients en rémission clinique, suggérant l'existence d'IgG non pathogènes spécifiques de la Dsg (192–194). Les Dsg, membres de la superfamille des cadhérines, contiennent quatre répétitions de cadhérines d'environ 110 acides aminées [domaines extra-cellulaires (EC) 1 à 4] et une ancre extracellulaire (EC5) dans l'ectodomaine C-terminal (**Fig. 18**) (195). Les propriétés adhésives des Dsg reposent sur les domaines EC1 et EC2 ; la jonction entre ces domaines étant caractérisée par des sites de liaison au Ca^{2+} (195). Cette différence de pathogénicité des anticorps anti-Dsg en fonction du domaine reconnu a été confirmée par des études in vivo et in vitro démontrant que les auto-anticorps IgG pathogènes ciblent préférentiellement la partie NH2-terminale de Dsg3 (196,197). Les auto-anticorps non pathogènes reconnaissent les épitopes des ectodomains de la partie COOH-terminale de la Dsg proches de la membrane (198,199). En effet, des travaux ont montré que les anticorps monoclonaux se liant aux domaines EC1-2 de Dsg3 de manière Ca^{2+} -dépendante étaient capables d'induire une acantholyse alors que ceux se liant aux domaines EC2-5 de manière Ca^{2+} -indépendante n'induisaient pas d'acantholyse (195). Les domaines EC1-2 de Dsg ont été démontrés comme étant la principale région cible reconnue par les auto-anticorps des patients atteints de pemphigus (196,200,201). En comparant des ELISA commerciaux anti-Dsg3 conventionnels et traités à l'EDTA, un chélateur du Ca^{2+} , Kamiya *et al.* ont démontré la présence d'anticorps anti-Dsg dirigés contre les épitopes Ca^{2+} -dépendants des domaines extracellulaires de Dsg3 ; ces anticorps étaient capables d'induire la dissociation des kératinocytes in vivo et étaient plus fortement corrélés à l'activité clinique que les anticorps anti-Dsg3 totaux (195,202).

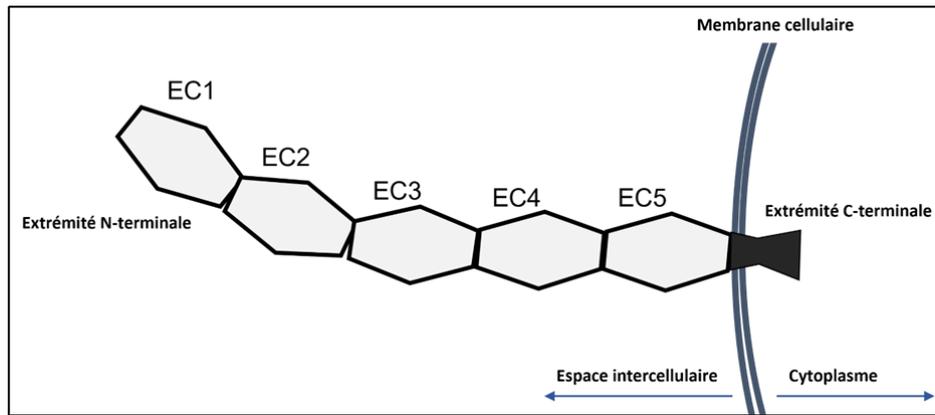


Figure 18. Représentation schématique d'une desmogléine desmosomale et de ses domaines extracellulaires.

Dans les sous-types de pemphigus, les prédominances d'anticorps anti-Dsg1 et anti-Dsg3 pourraient affecter directement la présentation clinique en raison de l'expression différentielle dans la peau et les muqueuses des différentes desmogléines (**Fig. 5**). Les patients atteints de PV présentent souvent une atteinte cutanéomuqueuse et des anticorps circulants dirigés contre Dsg1 et Dsg3 ; ceux atteints de PS présentent uniquement des anticorps dirigés contre Dsg1 et une atteinte cutanée isolée. En effet, Dsg1 et Dsc1 présentent un gradient de distribution inverse à celui de Dsg3 et Dsc3 (**Fig. 5**). Les Dsc1 et Dsg1 sont principalement exprimées dans les couches suprabasales de l'épiderme, tandis que la Dsg3 est exprimée principalement dans les couches basales de l'épiderme. Dans les muqueuses, alors que Dsg3 est exprimée sur toute la hauteur de l'épiderme, Dsg1 est essentiellement exprimée dans les couches superficielles et la Dsc1 n'est pas exprimée (32). La différence de cibles antigéniques des auto-anticorps, l'expression différentielle de Dsg1 et de Dsg3 dans les épithéliums et la théorie de la compensation Dsg1/Dsg3 selon laquelle les Dsg peuvent compenser la fonction adhésive de l'autre lorsqu'elles sont exprimées sur le même kératinocyte permettraient d'expliquer les différences cliniques observées entre PV et PS (203). Par ailleurs, l'interaction hétérophilique de Dsg2, qui est surexprimé dans le PV, avec Dsg3 a été proposée comme un mécanisme de compensation car il a été montré que cette interaction résistait à l'encombrement stérique induit par les auto-anticorps (204). Cependant, ce concept de compensation ne permet pas d'expliquer l'ensemble des formes cliniques des différents variants de pemphigus et les formes atypiques des variants prédominants, montrant que d'autres facteurs cellulaires ou moléculaires influent sur l'étendue de cette compensation fonctionnelle (205,206). Avec un meilleur profilage immunologique des différents variants de pemphigus, une modification de la théorie de la compensation et des mécanismes physiopathogéniques alternatifs pourraient ainsi être découverts (207).

Le mode d'action des auto-anticorps pathogènes retrouvés chez les patients atteints de pemphigus est désormais bien défini. La déplétion desmosomale qui conduit à l'acantholyse peut être divisée en deux mécanismes majeurs (**Fig. 19**). Premièrement, l'interaction des auto-anticorps IgG avec les sous-domaines EC1 NH2-terminaux de Dsg1 et Dsg3 conduit à un encombrement stérique interférant dans

les liaisons *trans*-Dsg (208–210) et perturberait également l'interaction entre Dsg et flotilline (211), conduisant à la perte de l'intégrité desmosomale (**Fig. 19A**). Le second mécanisme est une altération de la signalisation intracellulaire induite par la liaison d'auto-anticorps aux kératinocytes et affectant les acteurs de ces voies (212); des modifications de p38 MAPK, de la protéine kinase C (PKC), des c-Jun N-terminal kinases (JNK), de RhoA et des caspases (caspases 3, 6, 8 et 9) seraient notamment impliquées dans l'endocytose et la déplétion des Dsg, et participeraient à la perte de l'intégrité desmosomale et de l'adhésion inter-kératinocytaire (**Fig. 19B**) (213–217). Dans le PPN, la liaison des auto-anticorps inhiberait également la protéine A2ML1 impactant l'activation d'un inhibiteur de protéase (**Fig. 19C**) (218).

En plus des auto-anticorps IgG anti-Dsg, divers anticorps, ciblant d'autres auto-antigènes, et de pathogénicité incertaine ont été identifiés, notamment par des études protéomiques, dans les sérums d'une minorité de patients présentant diverses formes de pemphigus (207,219,220). Des auto-anticorps IgG et IgA contre les desmocollines (Dsc1, Dsc2 et Dsc3 ; des cadhérines Ca²⁺-dépendantes) ont été détectés dans un pourcentage variable de patients atteints de pemphigus selon les cohortes (5-60%), selon l'isoforme de Dsc et le variant de pemphigus (221,222). Leurs taux circulants sont plus élevés dans les variants rares tels que le pemphigus à IgA, le PPN et le pemphigus herpétiforme (221,222). Les anticorps anti-Dsc3 peuvent entraîner une acantholyse et un clivage intra-épidermique dans des cultures kératinocytaires et des cultures de peau humaine en interférant avec la liaison Dsc3/Dsg1 de la jonction inter-kératinocytaire (223). Des IgG dirigées contre le récepteur α à l'acétylcholine (AChR) des kératinocytes ont également été rapportés chez jusqu'à 85 % des patients atteints de pemphigus et participent à la perte d'adhérence des kératinocytes (**Fig. 19C**) (224). Ces auto-anticorps sont dirigés contre les AChR muscariniques mais aussi mitochondriaux (225). Comme pour les anticorps anti-Dsg, le titre d'anticorps anti-AChR muscarinique a été rapporté comme corrélé positivement à la sévérité clinique du pemphigus (224). D'autres anticorps réagissent contre divers composants des desmosomes, tels que les desmoplakine 1 et 2, la Dsg4, la E-cadhérine, la plakoglobine, la plakophiline 3, et la pemphaxine (226–231). Certains de ces anticorps ont une utilité diagnostique dans certains variants de pemphigus, tels que les anticorps anti-envoplakine, anti-périplakine et anti-desmoplakine dans le PPN. D'autres sont dirigés contre des inhibiteurs de protéase tels que l'A2ML1 ou bien contre des pompes calciques telles que SPCA1 (Ca/Mg-ATPase codée par le gène ATP2C1), qui est impliquée dans l'adressage à la membrane de protéines et dont la mutation est responsable d'une dermatose acantholytique génétique (maladie de Hailey-Hailey) (232). Hormis les anticorps anti-Dsg, la pathogénicité et l'importance *in vivo* de ces multiples auto-anticorps présents dans le sérum des patients atteint de pemphigus reste incertaine. Ils pourraient résulter d'un épitope spreading secondaire à la perte de tolérance immunitaire ou avoir une action synergique avec les anticorps anti-Dsg (232). Bien que des modèles de souris aient été conçus pour évaluer la perte de l'antigène cible de ces auto-anticorps ou

l'effet direct de certains d'entre eux (233,234), leur rôle précis dans la pathogénèse du pemphigus reste à confirmer (235).

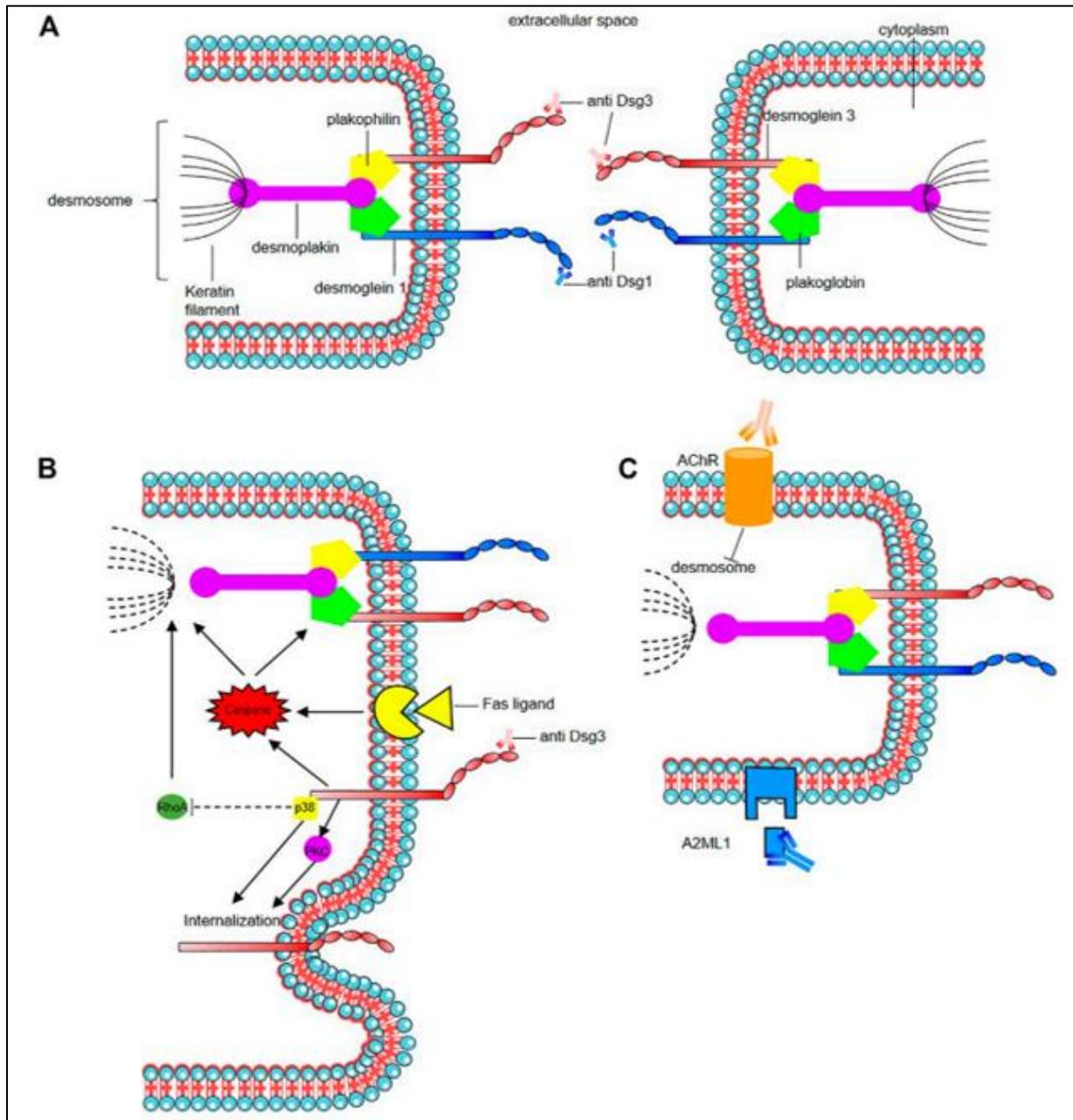


Figure 19. Mode d'action des auto-anticorps pathogènes dans le pemphigus (provenant de Lim et al, Front Mol Biosc, 2022 – Annexe I)

(A) Interaction des auto-anticorps pathogènes avec l'extrémité NH₂-terminale de la protéine desmosomale, entraînant un obstacle stérique à la liaison trans-Dsg. (B) La liaison des auto-anticorps à la desmogléine induit une altération de la signalisation cellulaire affectant les composants de multiples voies, y compris p38 MAPK (p38), protéine kinase C (PKC), y compris une internalisation de Dsg3. La liaison des auto-anticorps réduit l'activité de RhoA d'une manière dépendante de p38MPAK, ce qui a un impact sur la réorganisation du cytosquelette d'actine et entraîne une perte supplémentaire de l'intégrité desmosomale. La voie de signalisation des caspases peut être activée par le signal induit par la liaison des auto-anticorps à la desmogléine par la voie du ligand/récepteur Fas. (C) Les auto-anticorps IgG anti- α -récepteur de l'acétylcholine (AChR) induisent un signal participant au désassemblage des desmosomes.

b. Lymphocytes B – Lymphocytes T

Après la mise en évidence du caractère pathogène des sérums et de leur auto-anticorps, des modèles murins de pemphigus ont permis de confirmer la pathogénicité de cellules immunitaires nécessaires à leur production. Dans ces modèles, de la Dsg3 a été injectée à des souris Dsg3 $-/-$, à qui manquait donc la tolérance contre les Dsg3, pour générer des lymphocytes B et T autoréactifs contre la Dsg3 ; l'injection de ces lymphocytes B et T réactifs à des souris immunodéficientes (Rag2 $-/-$) mais Dsg3+ a permis de d'induire une réponse spécifique anti-Dsg3 médiée par les cellules auto-réactives in vivo (197,236–238). Ces souris présentaient des érosions cliniques et une acantholyse suprabasale identique au pemphigus en lien avec une production d'un panel d'auto-anticorps anti-Dsg3 (239).

Si les auto-anticorps produits par les LB constituent les médiateurs pathogènes clés et directs du pemphigus, des études récentes soulignent l'importance d'acteurs toujours plus nombreux de l'immunité s'intégrant dans un tableau de dérégulation auto-immune plus large ; mettant l'accent, notamment, sur le rôle des sous-populations de LT. La rupture de tolérance envers certains auto-antigènes médiée par les LT périphériques constituerait un événement critique participant à la production d'auto-anticorps par les LB autoréactifs, à l'inflammation et à l'infiltration des tissus par les cellules immunitaires. Les modifications des populations lymphocytaires B au cours du pemphigus ont principalement été révélés lors d'études thérapeutiques évaluant l'efficacité du rituximab ; ces modifications sont exposées dans la partie effet immunologique du rituximab plus loin dans ce manuscrit (section D.7.c).

- **Balance Th1/Th2**

L'implication de LT auxiliaires autoréactifs a été postulée dans le pemphigus depuis plusieurs dizaines d'années. Les patients atteints de pemphigus possèdent des cellules Th1 et Th2 Dsg3-réactives (240,241); certains groupes ayant mis en évidence des fréquences comparables de cellules Th1 et Th2 (242); d'autres ayant montré une prédominance de cellules Th1 auto-réactives (243). Des études sur modèle murin ont permis dès 2008 de mettre en évidence que certains clones de LT CD4+ Dsg3-réactifs étaient capables d'induire un phénotype clinique de pemphigus en activant des LB Dsg3-réactifs (244). Des études réalisées sur modèle de souris transgénique humanisé HLA-DRB1*04:02 ont montré que les LT reconnaissent les épitopes de la Dsg3 humaine (245); reconnaissance qui était associée à une interaction des LT et des LB dépendante de CD40-CD40L et qui conduisait à l'induction d'auto-anticorps IgG pathogènes responsables d'acantholyse. Il est probable que les cellules Th1 et Th2 Dsg3-réactives jouent toutes deux un rôle dans la physiopathogénie du pemphigus. Le rapport Th1/Th2 influence notamment la commutation isotypique ; un environnement cytokinique Th2 favorisant la production d'IgG4, qui ont été démontrées comme l'isotype le plus fréquemment pathogène dans le pemphigus, alors qu'un environnement cytokinique Th1 favorise la production d'IgG1 (246). La plupart des études se sont concentrées sur le rôle des cellules Th2, montrant qu'elles étaient essentielles au développement de la maladie. La fréquence des cellules Th2 réactives à Dsg3 est significativement plus élevée chez les

patients ayant un pemphigus que chez les individus sains, et leur taux circulant est positivement corrélé à l'activité de la maladie (241). Ces LT autoréactifs reconnaîtraient des domaines limités des Dsg, notamment le domaine EC3 de la Dsg3 (247). Les niveaux sériques de cytokines de la voie Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) sont significativement plus élevés chez les patients atteints de PV en comparaison aux individus sains, alors que l'IFN γ associé à la voie Th1 serait diminué, renforçant l'hypothèse d'une prépondérance de la voie Th2 par rapport à la voie Th1 dans la pathogenèse du PV à la phase active de la maladie (248,249). Cette balance Th2/Th1 est évolutive au cours des phase d'activité et de rémission du pemphigus (250).

- **Lymphocytes Th17**

Le rôle d'autres sous-types de LT dans la pathogenèse du pemphigus est suggérée mais repose sur des études moins nombreuses car ces populations sont de description plus récente. L'implication des lymphocytes Th17, identifiés par leur expression spécifique du facteur de transcription ROR γ t, a été mise en évidence dans diverses maladies inflammatoires ou auto-immunes et, plus récemment, dans le pemphigus (251–253). Dans le sang des patients ayant un PV, la fréquence des lymphocytes Th17 est significativement plus élevée que chez les donneurs sains, en particulier lorsque le pemphigus est actif cliniquement au début de la maladie ou lors de rechutes (254). De plus, les taux sériques de cytokines produites par les Th17 (IL-17A, CCL20, IL-21) sont relativement plus élevés chez les patients atteints de PV (254–256); dans une de ces études, le taux d'IL-21 mais pas celui d'IL-17 était corrélé au taux circulant d'anticorps anti-Dsg (256). de même, les niveaux d'expression relatifs de ROR γ t, CCR6 et CCL20 sont augmentés dans le sang et les biopsies cutanées de PV (255). Ces lymphocytes Th17 sont présents en peau lésée dans le pemphigus (257). La comparaison des profils d'expression transcriptomique de la peau lésée par rapport à la peau péri-lésionnelle et à la peau saine d'un patient atteint de pemphigus a permis d'identifier une signature immunitaire dominée par IL-17A, avec une forte expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation IL-17A (254).

- **Lymphocytes Tfh**

Parmi les LT, d'autres sous-types ont un rôle immunitaire majeur dont les Tfh ; un sous-ensemble de LT CD4⁺ exprimant BCL6 et CXCR5, ce qui leur permet de migrer dans les centres germinatifs où ils sont nécessaires à la sélection des LB producteurs d'anticorps de haute affinité et au développement de LB mémoires (258,259). Les Tfh expriment les récepteurs de surface PD-1 (programmed death 1), ICOS (inducible costimulator) et CD40L, et sécrètent de l'IL-21 pour favoriser la croissance des LB, leur activation, le switch de classe d'immunoglobulines, l'hypermutation somatique et la différenciation des LB spécifiques de l'antigène (260). De plus, parmi les Tfh circulants, plusieurs sous populations aux phénotypes et fonctions différentes ont été décrits (Tfh1, Tfh2, Tfh17) (261). L'implication des cellules Tfh dans la pathogenèse du pemphigus provient d'études montrant la présence de cellules auto-réactives sécrétant de l'IL21 chez 50% des patients ayant un pemphigus (262) ; d'autres ont montré que la

fréquence des cellules Tfh circulantes et que les concentrations plasmatiques d'IL-21 étaient significativement plus élevées chez les patients atteints de PV que chez les témoins (254). De plus, les proportions de cellules Th17 et Tfh circulantes dans le pemphigus sont corrélées aux proportions de LB mémoires CD27+ spécifiques de la Dsg (256); et les patients atteints de pemphigus cliniquement actif présentent des niveaux plus élevés de cellules Tfh17 Dsg3-réactives (262). D'autre part, des cocultures LB/LT in vitro ont montré que les lymphocytes Tfh17 sont les principaux responsables de l'induction de la production d'autoanticorps anti-Dsg par les LB (254). Dans un modèle murin, le traitement par anticorps neutralisant ICOS, exprimé par les lymphocytes Tfh CXCR5+PD-1+, a permis de diminuer la production d'anticorps anti-Dsg3 et a retardé la progression du PV (263). Ces éléments soulignent que les cellules Tfh jouent un rôle majeur dans la pathogenèse du pemphigus.

- **Lymphocytes Treg**

Les Tregs, de phénotype $TCR\alpha\beta$ +Foxp3+CD4+, sont impliqués dans la prévention et la régulation de l'auto-immunité par leur activité immunosuppressive (264). Diverses études ont montré que la proportion de Treg dans le sang des patients atteints de PV est plus faible que chez les donneurs sains (247), et que les proportions de Th17 et de Treg sont inversement corrélées, indiquant que l'équilibre de la balance Th17/Treg, pro-immunitaire/immunosuppressive, est perturbée dans la PV(251,255) (251,255). D'autre part, les patients avec un taux plus faible de Treg au diagnostic ont plus de chance de rechute après traitement par rituximab (265). In vivo, sur modèles murins de PV, des études ont montré que les Tregs participent au contrôle de la production d'anticorps anti-Dsg3 et que le transfert adoptif de Tregs ou la déplétion des Tregs endogènes impacte la production d'anticorps anti-Dsg3 en la supprimant ou en l'augmentant, respectivement (266). Parallèlement, des études in vitro ont montré que les Tregs de type 1 (CD4+CD25^{fort}FOXP3-) spécifiques de Dsg3 sécrètent de l'IL-10, du TGF- β et de l'IL-5 lors d'une stimulation auto-antigénique et inhibent la prolifération des LT CD4+ Dsg3-réactifs d'une manière dépendante de l'autoantigène suggérant l'implication des Tregs dans la restauration de la tolérance contre les auto-antigènes cibles du PV (267).

c. Cellules myéloïdes

Avec les cellules lymphoïdes, les cellules myéloïdes représentent l'autre compartiment majeur du système immunitaire et comporte les DCs, les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (268). Dans la peau, les cellules dendritiques (DC1c, DC2c) et les LCs font partie des CPA qui permettent la transition entre immunité innée et adaptative. Les DCs participent à la défense contre les pathogènes infectieux dans le cadre de l'immunité innée et influent sur la réponse adaptative médiée par les LT et les LB (269,270). Bien que ces cellules soient des acteurs importants dans la balance immunitaire, peu d'éléments sont disponibles quant à leur implication dans la pathogenèse du pemphigus. In vitro, les CPA de patients ayant un pemphigus et d'individus sains porteur de l'allèle HLA-DRB1*0402 du CMHII peuvent apprêter la Dsg3 et la présenter efficacement aux LT, induisant leur activation (271).

Les études s'y intéressant pointent cependant vers un rôle potentiel des DCs dans la pathogénèse du pemphigus. En effet, la proportion de DCs est augmentée dans le sang des patients atteints de pemphigus et ces DCs présentent des modifications d'expression de marqueurs de stimulation (CD40 et CD80) et d'inhibition (PSGL1 et ILT3) (272). Une étude *in vitro* a démontré que les LCs étaient capables de capturer et de présenter l'antigène Dsg3 aux LT (273). Ces LCs expriment le récepteur à l'IL2 et la perturbation de leur récepteurs de l'IL2 inhibe l'expansion des Tregs médiée par les LCs, suggérant que les LCs pourraient avoir un rôle prépondérant dans la tolérance des auto-antigènes épidermiques (273).

Une autre population qui a été montrée comme modifiée au cours du pemphigus est celle des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs), un groupe de cellules myéloïdes immatures qui comprend des MDSCs monocytiques ou polymorphonucléaire-like qui inhibent l'activité des LT (274). Une population de MDSCs CD66b+ CD11b+ a été montrée comme augmentée chez les patients ayant un pemphigus actif mais pas chez ceux en rémission (275,276) ; cette population de MDSCs peut supprimer la prolifération des LT *in vitro* lors de stimulations allogéniques et produit de l'IL10. De plus la fréquence de cette population serait corrélée au ratio de cellules Th2/Th1 ce qui suggère un rôle possible de cette population de MDSCs dans la régulation de la réponse T dans le pemphigus (276).

Enfin, les DC plasmacytoïdes, qui dérivent d'un progéniteur lymphoïde et non pas myéloïde (277), pourraient aussi intervenir dans la pathogénèse du pemphigus car elles ont été décrites comme infiltrant la peau lésée de patients ayant un pemphigus (278).

d. Infiltrat immunitaire dermique dans le pemphigus

L'étude des acteurs de l'immunité dans les MBI a longtemps été limitée aux acteurs circulants. En effet, il est difficile d'obtenir des échantillons d'organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, biopsie médullaire) dans les pathologies auto-immunes en comparaison aux hémopathies tumorales telles que les leucémies ou les lymphomes.

L'importance du rôle de l'infiltrat immunitaire local dans les pathologies tumorales et notamment de structures lymphocytaires intra et péri-tumorales a renforcé l'intérêt d'étudier plus en profondeur les acteurs immunitaires infiltrant les sites lésés dans le pemphigus. En effet, la peau adulte contient notamment 20 milliards de LT, environ deux fois plus que dans le sang circulant (279). Parmi les LT résidents dans la peau, les LT mémoires CD8+, situés dans les couches basales de l'épiderme, constituent la population la plus importante (280). Des LB mémoires résidents ont aussi été mis en évidence dans la peau (281). Ainsi, l'épiderme et le derme contiennent de manière physiologique des acteurs immunitaires mémoires permettant la réponse rapide aux processus invasifs.

Des travaux récents ont ainsi mis en évidence la présence d'infiltrats lymphoïdes ectopiques caractérisés comme étant proche de structures lymphoïdes tertiaire en peau lésée de pemphigus (282).

- Structures ectopiques lymphocytaires

Les structures lymphoïdes tertiaires (TLS), aussi appelées structures lymphoïdes ectopiques (ELS), sont des structures tissulaires associées aux infections chroniques et aux maladies inflammatoires. Malgré leur présence en contexte pathologique, ces structures sont une composante normale, bien que transitoire, du système immunitaire facilitant la réponse locale visant à atténuer les processus d'inflammation et à résoudre les infections (283). Ces structures, à leurs stades les plus matures, sont architecturalement et fonctionnellement proches des organes lymphoïdes secondaires. Contrairement aux organes lymphoïdes secondaires, de localisation prédéterminée durant l'embryogénèse, ces ELS apparaissent après la naissance dans des sites non prédictibles, du fait d'une inflammation persistante en lien avec des conditions variées aussi bien infectieuses, tumorales (**Fig. 20**), qu'auto-immunes (284). Les lymphocytes et les autres cellules constituant ces structures répondent à une stimulation allo ou auto-antigénique locale, dont la disparition entraîne la disparition des TLS (285). L'importance de l'accumulation de lymphocytes et leur degré d'organisation au sein de tissus périphériques non lymphoïdes dépend de l'importance et de la durée de la stimulation antigénique (283). Ainsi, les agrégats lymphoïdes vont varier d'un infiltrat épars de lymphocytes à des tissus hautement organisés avec toutes les caractéristiques des TLS. Ces agrégats lymphoïdes pourraient être fonctionnellement non-équivalents, ce qui a amené à une classification du spectre de ces infiltrats (283,286). Ainsi, les TLS sont généralement définis comme un agrégat de lymphocytes associé à des composants stromaux normalement absents de ces tissus: cellules dendritiques folliculaires (FDCs), cellules réticulaires folliculaires (FRCs), HEVs (High endothelial venules) (283). Cependant, certains auteurs considèrent que l'expression de CXCL13 par les cellules périvasculaires en présence de LB et de LT, malgré l'absence de FDCs, permet de caractériser des TLS de stade précoce (287). Les infiltrats moins organisés auxquels ils manquent certains attributs des TLS sont ainsi nommés en fonction des équipes, infiltrats ELS-like, TLS de stade précoce ou agrégats lympho-myéloïdes (88).

Ces TLS sont souvent observés dans des tissus endommagés par des réponses auto-immunes. En effet, des TLS sont décrits dans la synoviale de patients avec une polyarthrite rhumatoïde (PR), dans les glandes salivaires de patients avec des syndromes de Gougerot-Sjögren ou dans les reins de patients avec des néphrites lupiques (288–290). Ces TLS exacerbent l'inflammation locale médiée par le processus auto-immun en lien avec la réponse à des auto-antigènes présents en faible abondance ou hautement dépendants du contexte (88); ils contiennent notamment fréquemment des LB et des LT réactifs dirigés contre des auto-antigènes locaux, résultats d'expansion clonale, et ayant subi des hypermutations somatiques (291). La formation des TLS requiert la production locale au sein de l'organe lésé de cytokines et de chimiokines variées (TNF α , Lymphotoxine α , CXCL13, CCL21, CCL19, CXCL12); cependant, l'expression locale de ces cytokines dans des modèles de souris transgéniques n'entraîne pas de phénotype de maladie auto-immune organique, bien qu'induisant la

formation de TLS (283). L'activation des LB en dehors des organes lymphoïdes secondaires implique un sous type de LT CD4+ helper, appelé Tph (T peripheral helper) qui remplacerait les Tfh dans leur fonction (88); les Tph et Tfh expriment tous deux PD1, CXCL13 et l'IL-21 mais les Tph seraient négatifs pour Bcl6 et CXCR5 (88). Dans certaines pathologies auto-immunes, l'apparition de TLS a été décrite comme dépendante du facteur d'induction de la prolifération APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) et de BAFF (292). Dans les cancers, les TLS participent à l'immunité antitumorale mais peuvent donner naissance à des LB et plasmocytes autoréactifs qui prédisposent les patients au développement de conditions auto-immunes paranéoplasiques ou toxiques suite à l'utilisation de thérapies ciblant les checkpoints immunitaires (88). Dans certaines pathologies et sous certaines conditions, notamment dans l'athérosclérose ou dans l'acceptation d'allogreffes, les TLS ont aussi démontré un rôle protecteur via une régulation du processus inflammatoire, notamment par l'intermédiaire de l'activité des Treg et des cellules stromales fibroblastiques (293,294).

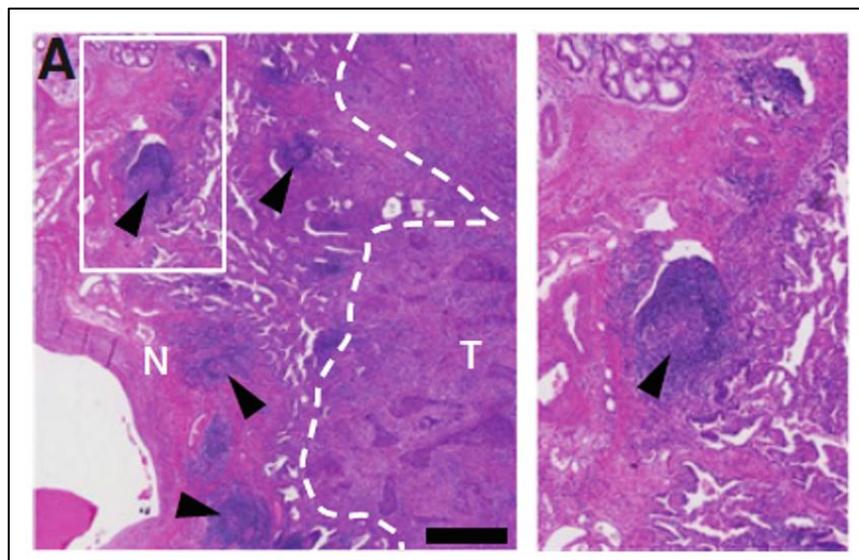


Figure 20. Structure lymphocytaire tertiaire péri-tumoraux dans le carcinome épidermoïde du poumon (provenant de Silina et al 2018, Cancer Res 2018 (287))

- Cellules immunitaires présentes dans la peau/muqueuse lésée de patients ayant un pemphigus

Les preuves de l'importance des processus inflammatoires mis en place localement, en périphérie dans les tissus lésés, au cours de maladie auto-immunes se sont accumulées au cours des dernières années. Vu Van *et al* ont montré en 2016 sur des modèles murins que les tissus lésés, et non pas les ganglions drainant ces tissus, étaient les principaux réservoirs LB autoréactifs pendant l'inflammation (295).

La peau, organe cible du pemphigus, constitue une niche pour l'accumulation de LB et de LT mémoires résidant à long terme dans les tissus, où ils peuvent assurer la médiation d'une immunité

protectrice durable mais peuvent également être impliquées dans l'apparition de maladies inflammatoires (296).

Ces ELS-like comportent des LT, mais aussi des LB à différents stades de maturation dont des PB, et des PC (282,297). Ces structures ELS-like sont présentes dans le PV et le PS (282,297). L'analyse du répertoire du BCR des LB lésionnels a montré une expansion clonale des LB (282,297). Ces infiltrats contiennent notamment des LB spécifiques de la Dsg1 et de la Dsg3 montrés en ELISPOT ; la culture des lymphocytes isolés de la peau péri-lésionnelle montrait la production de Dsg1 et de Dsg3 en ELISA et en immunoblot (282,297). Le pourcentage de LB spécifiques de la Dsg1 et de LB spécifiques de la Dsg3 est plus important dans les tissus lésés (62% et 31% respectivement) que dans le sang circulant (0.7 et 0.8% respectivement) (282). D'autre part, les LB lésionnels sont plus fréquemment CD27+ que dans le sang et le pourcentage de PB et de PC est plus important dans la peau (282). L'ensemble de ces données pointe vers un rôle majeur des ELS-like dans la maturation locale de LB autoréactifs qui aboutit à une production locale d'anticorps pathogènes. Ces résultats suggèrent que la peau pourrait constituer le réservoir principal des LB autoréactifs anti-Dsg. Le répertoire circulant d'auto-anticorps pourrait donc être fortement impacté par ces LB tissulaires ; ce que laisse supputer une étude ayant montré que le répertoire des LB circulants spécifiques de la Dsg reflétait peu le répertoire des auto-anticorps sériques (298).

Il a été montré que la plupart des LT infiltrant la peau du pemphigus sont des LT CD4+ exprimant l'IL-21 et l'IL-17a mais pas le CXCR5 typiquement exprimé par les Tfh (297). Ces LT ont ainsi le phénotype des Tph décrit dans les TLS et participerait à la maturation des LB au sein de ces agrégats lymphoïdes dermiques.

L'analyse de l'expression d'ARN des lymphocytes infiltrant la peau dans le pemphigus montre la surexpression de chimiokines impliquées dans la migration et la formation de tissus lymphoïdes, notamment CCL19, en comparaison aux donneurs sains montrant la capacité de recirculation des lymphocytes constituant ces structures (297). Or, des travaux récents suggèrent également que les cellules Treg des patients atteints de PV pourraient avoir des interactions défectueuses avec les ligands CCR4 et CCL22 (255), ce qui pourrait conduire à une réduction de leur homing vers les sites des lésions cutanées.

D'autre part, des CPA ont été mises en évidence en grand nombre en peau lésée de pemphigus. Une étude récente a notamment mis en évidence une proportion importante de LCs infiltrant les tissus péri-lésionnels de pemphigus (272). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui dérivent d'un progéniteur lymphoïde et non pas myéloïde (277), pourrait aussi intervenir localement dans la pathogénèse du pemphigus car elles ont été décrites comme représentant 10% de cellules infiltrant le derme en peau lésée de pemphigus (278).

La compréhension des changements des modifications du système immunitaire dans le sang périphérique mais aussi au sein des tissus lésés apparaît donc comme majeur afin d'affiner les thérapeutiques ciblant ces intervenant. L'évaluation de l'effet de ces thérapeutiques sur l'activité clinique de la maladie mais aussi sur les intervenants circulants et infiltrant les tissus et les ganglions permettra certainement d'affiner les traitements et leurs modes d'administration.

4. Thérapeutique du Pemphigus

Avant l'utilisation des corticostéroïdes systémiques, 75 % des patients atteints de pemphigus mouraient au cours de la première année de la maladie (299). Les complications telles que les infections ou les carences nutritionnelles contribuaient largement à cette mortalité élevée. L'introduction des corticostéroïdes systémiques et l'utilisation ultérieure d'autres agents immunomodulateurs ou immunosuppresseurs ont permis une nette amélioration de la survie des patients ayant un pemphigus (299). Cependant, le niveau d'immunosuppression requis pour améliorer les symptômes a induit ses propres complications. Plus récemment, les progrès concernant la compréhension de la pathogenèse du pemphigus et des mécanismes biologiques de la thérapeutique ont conduit à un changement de paradigme dans le traitement de cette maladie, de l'immunosuppression globale vers une restriction plus ciblée de l'auto-immunité.

a. Outils d'évaluation clinique

Afin d'évaluer l'efficacité des thérapeutiques, des scores mesurant l'activité clinique, cutanée et muqueuse, de la maladie ou la qualité de vie sont utilisés dans le pemphigus (300). Le score d'activité, validé par des panels d'experts internationaux, et le plus utilisé pour évaluer l'activité du pemphigus est le PDAI (Pemphigus Disease Area Index, **Annexe VI**) (300).

b. Traitements immunosuppresseurs conventionnels/Immunomodulateurs

L'immunosuppression globale par l'utilisation de corticostéroïdes systémiques reste un traitement de première intention de nombreuses maladies auto-immunes dont le pemphigus. Leur utilisation en monothérapie à des doses importantes et soutenues a longtemps représenté la première ligne thérapeutique du pemphigus (301). Au cours des dernières années, différents schémas thérapeutiques ont été utilisés pour les corticoïdes, aussi bien seuls qu'associés à d'autres ISA conventionnels ; ces associations visant à épargner la dose cumulée de corticoïdes systémiques afin de réduire le risque de complications liées à leur utilisation chronique. Actuellement, en fonction de l'accès aux thérapeutiques ciblées dans chaque pays, et en fonction des recommandations nationales et internationales, ils sont généralement initiés à une dose de 0,5 à 1,5 mg/kg/jour dans le but d'obtenir un contrôle initial rapide de la maladie puis une rémission complète (301). Les corticostéroïdes exercent leur effet dans les maladies auto-immunes par une action anti-inflammatoire forte, agissant sur un large panel de cellules

en régulant l'expression de gènes intervenant dans le métabolisme cellulaire, la croissance et l'apoptose des lymphocytes (302).

Les rechutes fréquentes à la décroissance des doses de corticoïdes conduisaient fréquemment à la nécessité d'une ré-augmentation des posologies conduisant à une utilisation au long cours responsable d'une morbidité et d'une mortalité importante (303). Afin d'épargner les corticoïdes et de contrôler la maladie des patients ayant un pemphigus réfractaire aux corticoïdes, divers agents immunosuppresseurs conventionnels non stéroïdiens ont été utilisés, majoritairement en association aux corticoïdes. Ces traitements (azathioprine, MMF, cyclophosphamide), utilisés en monothérapie n'ont jamais démontré d'efficacité supérieure aux corticoïdes pour obtenir la rémission complète (304). Ces ISA conventionnels (azathioprine, cyclophosphamide) utilisés en tant qu'adjuvant à la corticothérapie systémique permettent cependant une épargne cortisonique, autorisant une réduction plus rapide de la posologie des corticoïdes et en réduisant le risque de rechute à la décroissance (304). Ces ISA conventionnels sont cependant, eux aussi, responsables d'une morbidité spécifique en lien avec une augmentation du risque infectieux et de complications spécifiques, notamment hématologiques.

D'autre part, en parallèle des thérapeutiques systémiques, les patients ayant un pemphigus reçoivent habituellement un traitement local, notamment des corticoïdes locaux appliqués sur les lésions cutanées ou sur les muqueuses accessibles (buccale, génitale, anale). Les corticostéroïdes topiques sont appliqués directement sur les zones lésées ou en bain de bouche. D'autres traitements administrés localement ont aussi été rapportés comme bénéfiques dans le pemphigus (inhibiteur topique de la calcineurine, ciclosporine), bien que leur utilisation reste marginale (305,306). Une mauvaise hygiène buccale pouvant être un facteur contribuant à la persistance de lésions buccales de pemphigus, des soins dentaires et stomatologiques des foyers bactériens sont ainsi nécessaires après contrôle de la maladie (307). Des analgésiques ou anesthésiques topiques peuvent être utilisés pour faciliter l'alimentation ou les soins d'hygiène bucco-dentaire.

c. Rituximab et pemphigus

L'évolution majeure des dernières années dans le traitement des différentes formes de pemphigus a été apportée par l'avènement des thérapeutiques ciblées ayant permis de cibler spécifiquement les LB, médiateurs clés de l'immunité humorale du fait de leur production d'auto-anticorps pathogènes.

- **Efficacité thérapeutique du rituximab**

Le rituximab (RTX), un anticorps monoclonal (mAb) anti-CD20 chimérique murin-humain (portion Fc humaine associée à une région variable murine) qui se lie au CD20 sur sa partie extracellulaire (308).

Le marqueur de différenciation CD20 est une glycoprotéine transmembranaire ayant un rôle de canal calcique impliquée dans l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules B, exprimé à la surface des LB à partir du stade pré-B tardif dans la moelle osseuse, en passant par les cellules B folliculaires naïves et jusqu'à la population de cellules B mémoire. Cependant, les plasmocytes à longue durée de vie n'expriment pas le CD20 et survivent dans des niches spécifiques, notamment la moelle osseuse, le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) et les structures lymphoïdes cutanées (282,309). L'absence de CD20 sur modèle murins ou chez l'humain n'interfère pas avec la prolifération des LB mais peut mener à une hypogammaglobulinémie bien que le nombre de LB reste normal (310).

La liaison du RTX au LB entraîne leur mort par différents mécanismes (apoptose, cytotoxicité dépendante du complément, cytotoxicité dépendante des anticorps faisant intervenir les FcγR, phagocytose dépendante des anticorps) (311). La déplétion B induite par le RTX dépend donc d'éventuels polymorphismes individuels des différents intervenant dans cette mort cellulaire tels que le taux d'internalisation es LB liés au RTX ou les polymorphismes des FcγR (312).

Le RTX a été initialement développé et utilisé pour traiter les hémopathies lymphoïdes B. Le RTX a été utilisé pour la première fois dans le PNP en 2001 (313) et dans le PV en 2002 (314) avant que son efficacité chez les patients récalcitrant à la corticothérapie ne soit montrée dans de nombreuses séries rétrospectives non contrôlées avec un schéma d'injection « hématologique » (375 mg/m²/injection, une injection/semaine pendant 4 semaines) (315). Son efficacité avec des schémas d'injections hématologique ou « rhumatologique » (1000 mg, 2 injections séparées d'une semaine) a ensuite été étayé dans de nombreux essais ouverts non contrôlés (316) ; montrant son intérêt dans l'obtention de rémission complète et dans l'épargne cortisonique. Son efficacité a enfin été démontrée en 2017 dans une essai multicentrique contrôlé randomisé français comparant deux groupes de patients ayant un pemphigus modéré à sévère en première ligne de traitement ; le premier groupe recevant du RTX (1g à J0 et J14 puis 0.5g au 12^{ème} et 18^{ème} mois) en association à une dose modérée de prednisone (0.5-1.0 mg/kg/j) qui était diminuée sur 3 à 6 mois et le deuxième groupe recevant des corticoïdes à plus forte dose (1.0 – 1.5 mg/kg/j) diminués sur une durée de 12 à 18 mois (317). Dans le bras rituximab, 84% des patients atteignaient une rémission complète sans corticothérapie à 2 ans contre seulement 34% dans le bras corticothérapie seule. D'autre part, les patients du bras RTX montraient des doses cumulées de corticoïdes 3 fois moindres et 2 fois moins d'effets indésirables. En 2021, un essai contrôlé international a démontré la supériorité de l'association RTX et corticothérapie sur l'association MMF et corticothérapie quant à l'obtention de rémission complète du pemphigus à 1 an, la dose cumulée de corticoïdes reçus et le risque de rechute (318).

Le RTX est maintenant recommandé en première intention dans les PV et PS modérés à sévères en association à la corticothérapie systémique (101). Bien que le RTX soit plus coûteux que les ISA conventionnels, il a été montré en France que le coût initialement plus élevé du RTX était presque

entièrement compensé par la diminution des coûts liés à la gestion des poussées et des rechutes chez les patients recevant un traitement standard par corticostéroïdes seuls (319).

- Effets immunologiques du Rituximab dans le pemphigus

L'injection de RTX entraîne, en quelques heures, une déplétion des LB du sang périphérique des patients. Le pool de LB circulants se reconstitue au cours des 6 à 12 mois suivants à partir de progéniteurs B non déplétés (95). Cette déplétion affecte notamment les clones B autoréactifs responsables de la production d'auto-anticorps pathogènes et présents depuis de nombreuses années (320). La déplétion des LB matures et des PCs de courte durée de vie chez les patients atteints de PV entraîne une baisse des anticorps autoréactifs sériques anti-Dsg qui est progressive sur plusieurs mois (95). Cette déplétion de longue durée est en lien avec la déplétion des LB circulants mais aussi avec une diminution des LB des organes lymphoïdes secondaires, sans affecter cependant la moelle osseuse (321). Les PCs de longue durée de vie, majoritairement CD20⁻ et ne nécessitant pas la contribution de LB mémoires au maintien de leur survie, sont épargnés. Ainsi, le taux des anticorps produits par ces PCs, tels que ceux dirigés contre le tétanos et le pneumocoque, reste inchangé. Le taux d'auto-anticorps circulant évolue de manière parallèle à la baisse de l'activité clinique du pemphigus, questionnant la contribution respective dans la pathogénèse du pemphigus des LB mature CD20⁺ et des PCs de courte durée de vie, qui sont déplétés, et des PCs de longue durée de vie qui ne le sont pas (322).

L'effet thérapeutique du traitement par RTX chez les patients atteints de pemphigus semble opérer sur plusieurs niveaux. D'une part, en lien avec la disparition des clones B autoréactifs responsables d'une disparition des anticorps autoréactifs. Cependant, des LB autoréactifs anti-Dsg sont toujours présents chez les patients en rémission. Ces clones B dirigés contre les Dsg sont cependant présents en moins grande quantité avec une diminution de la fréquence des LB CD19⁺CD27⁺ anti-Dsg⁺ (323). Deuxièmement, en lien avec une repopulation prolongée et continue de LB naïfs porteurs d'un nouveau répertoire et une réapparition nettement retardée des LB mémoires sont observés après le traitement par RTX (324). Après repopulation, le nombre de LB CD19⁺ circulants, même 6 ans après l'injection, est beaucoup plus faible qu'avant traitement (324). Ce blocage prolongé de la maturation des LB inhibe également le processus de commutation isotypique des Ig, réduisant ainsi les niveaux de LB circulants auto-immuns IgG⁺ et d'auto-anticorps (324). Cette modification durable du ratio LB naïfs/mémoire explique en partie l'effet thérapeutique prolongé du RTX chez les patients atteints de pemphigus. De plus, les populations de LB transitionnels et de Breg sécrétant de l'IL-10 sont augmentés après repopulation circulante chez les patients en rémission complète en comparaison aux patients au stade actif de la maladie (324). L'augmentation de LB ayant un profil Breg a aussi été mise en évidence chez des patients en rémission complète après des traitements autres que le RTX, comme les IgIV ou les CS (325,326). Cette repopulation par des Breg, participant à la régulation de la réponse immunitaire,

pourrait participer au maintien de la tolérance immunitaire au long terme dans les suites du traitement par RTX (327,328).

Malgré cet effet prolongé, des rechutes surviennent chez plus de 80% des patients en un temps médian de 79 mois après un cycle unique de RTX (324). Ces rechutes sont associées à la persistance ou à la réémergence de clones de cellules B anti-Dsg autoréactifs (320). Le risque de rechute est plus important chez les patients les plus sévères initialement (PDAI>45) ou ayant des taux circulants d'anticorps anti-Dsg1/3 élevés à 3 mois après traitement (265). A l'inverse, les patients avec une activité clinique moins importante (PDAI<45), les patients plus âgés et ceux ayant reçu des doses plus élevées de RTX seraient moins susceptibles de présenter une rechute précoce (329). Il est possible, mais discuté, que des doses plus élevées de RTX permettent d'obtenir une déplétion plus profonde des LB et que le système immunitaire plus faible des personnes âgées rende moins probable la réémergence de clones de LB anti-Dsg. Parallèlement, le suivi à long terme des LB autoréactifs et des anticorps chez les patients atteints de pemphigus traités par RTX a mis en évidence un processus de régulation complexe; chez les patients en rémission, il y avait moins de LB autoréactifs que chez les patients atteints de pemphigus actif, et au sein de cette population de LB, il y avait une proportion plus élevée de cellules IgM+ Dsg3+ que de cellules IgG+ Dsg3+, en association avec un réarrangement du répertoire d'Ig qui était passé d'un profil oligoclonal à polyclonal (324). De plus, les anticorps anti-Dsg autoréactifs restants détectés chez les patients en rémission semblent cibler des épitopes non pathogènes de la Dsg (330).

Une réduction des taux de rechute, ou l'allongement du délai avant rechute, peut être obtenu par la modification des modalités d'administration du RTX chez les patients atteints de pemphigus, notamment grâce à des protocoles de réinjections séquentielles. Ainsi dans l'essai contrôlé randomisé comparant le RTX en association à corticothérapie orale vs corticothérapie orale seule, les patients recevaient deux perfusions de 1 g de RTX administrées à quinze jours d'intervalle au début de l'étude, puis 0,5 g de RTX aux 12^{ème} et 18^{ème} mois (317). Avec ce régime incluant des réinjections ultérieures, 89% des patients étaient en rémission complète à 2 ans contre 34% de ceux ayant reçu seulement de la prednisone seule. En plus de démontrer une efficacité supérieure dans le contrôle de la maladie, ce protocole thérapeutique permettait de réduire par deux la dose cumulée de corticoïdes reçus et par trois le taux cumulé d'événements indésirables graves.

D'autre part, 10 à 20% des patients atteints de pemphigus semblent être résistants au traitement par RTX (317). La persistance d'une réponse humorale aux rappels antigéniques vaccinaux montre que certains LB mémoires ne sont pas déplétés, tout comme l'examen des organes lymphoïdes secondaires après traitement par RTX (331). Certains LB pourraient être moins susceptibles d'être déplétés par le RTX et pourraient donc persister après traitement et donc poursuivre une éventuelle activité auto-réactive; en effet certains LB mémoires CD27+ présentent une expression diminuée de CD20 qui les rendraient moins sensibles à la déplétion ; d'autre part des transcrits alternatifs de CD20 (D393-CD20) ont été décrits

dans les lymphomes mais aussi dans le pemphigus (332). Après traitement par RTX, la perturbation de la tolérance immunitaire pourrait conduire à l'apparition de nouveaux clones de LB autoréactifs par épitope spreading. Cependant, la persistance de clone autoréactifs dans les organes lymphoïdes et les études montrant que l'épitope spreading est rare, rendent cette dernière hypothèse mécanistique de rechute moins probable (323). L'absence de déplétion des PCs autoréactifs à longue durée de vie responsable d'une production persistante d'anticorps anti-Dsg 3 pourrait aussi participer à la résistance au traitement chez certains patients (320). La production d'anticorps anti-chimères humains (HACA) contre les fragments murins du RTX pourrait entraver l'efficacité des injections ultérieures et contribuer à l'absence de réponse thérapeutique de certains patients (333). Cependant, l'analyse post-hoc de l'essai RITUX3, ne supportait pas cette hypothèse compte tenu de l'absence de diminution du taux de rémission complète sans traitement à 2 ans chez les 59% de patients de l'étude présentant des HACA (334).

Ainsi, les changements induits par le RTX dans d'autres populations cellulaires que les LB sont probablement au premier plan du maintien la rémission, par le contrôle qu'ils exercent sur l'expansion clonale des LB autoréactifs résidents et persistant après traitement. Le RTX ne modifie pas les taux périphériques de LT CD4+/CD8+ ou leur fonction (95). Cependant, le traitement réduit rapidement les LT autoréactifs CD4+ anti-Dsg3 par la privation de la stimulation par les LB (322). Alors que le RTX n'affecte pas les Tfh et Treg folliculaires des ganglions, les pTreg, qui semblent diminués par rapports aux individus sains avant traitement, ont montré une évolution variable après traitement selon les études (335). Une autre étude a suggéré que la durabilité de la réponse au RTX dans le pemphigus pourrait reposer sur la diminution des Tfh spécifiques de la Dsg ; en effet, une proportion faible serait corrélée à une déplétion soutenue des LB autoréactifs mémoire IgG+, conduisant à la disparition des cellules sécrétant les anticorps anti-Dsg (256).

- **Effets indésirables et rituximab**

Le RTX induit une immunosuppression, comme les ISA conventionnels, mais persistante dans le temps sur la population B. En effet, la repopulation circulante par les LB ne survient que 6 à 12 mois après le traitement par RTX. Cette immunosuppression s'accompagne d'un risque infectieux majoré, bien que les effets indésirables sévères ne surviennent que chez 2.1% des patients traités par RTX, des décès étant rapporté chez 1% des patients (336). Le risque individuel du RTX dans ces effets indésirables est difficile à mesurer du fait de son association quasi-systématique à la corticothérapie systémique. Ces effets indésirables consistent majoritairement en diverses infections bactériennes ou virales, intéressant particulièrement du tractus respiratoire et urinaire ainsi que la peau (334,337). Alors que le RTX n'affecte pas le nombre de LT CD4+ et CD8+ circulants, la susceptibilité aux infections bactériennes et aux infections opportunistes pourrait être en lien avec l'interférence du traitement dans l'activation des LT par les LB, nécessaire à une réponse lymphocytaire T mémoire optimale. Par ailleurs, le RTX augmente le risque de réactivation de virus latents (HSV, CMV, VHB, VHC, VIH) (311).

Des cas d'hypogammaglobulinémie sont décrites avec le RTX dans la PR et les lymphomes, et serait associé à un nombre important d'injections (338,339). L'hypogammaglobulinémie augmente de manière importante le risque d'infection sévère. Cependant, aucun cas n'a été décrit dans le pemphigus ; une diminution du taux d'IgM totales a été observée chez 19.6% des patients ayant une MBAI traitée par RTX alors que ce taux atteignait plus de 50% chez ceux ayant eu des ISA conventionnels et/ou des immunoglobulines intraveineuses (340). La disparition de LB naïfs et de nouveaux LB mature, et des PCs de courte durée de vie pourrait être responsable de cette diminution des IgM ; alors que l'épargne des PCs de longue durée de vie permettrait le maintien des taux d'IgG dans les schémas étudiés qui comprenait peu de réinjections (341). Dans d'autres MBAI, telles que les pemphigoïdes des muqueuses où un nombre plus important d'injections de RTX est nécessaire pour obtenir un taux de rémission complète proche de celui obtenu dans le pemphigus, une augmentation des complications hématologiques ou infectieuses n'a pas été mise en évidence (Annexe IV, (342)). Ainsi, l'utilisation du RTX avec des schémas de réinjections séquentielles afin d'obtenir la rémission ou prévenir les rechutes dans les MBAI ne semble pas préjudiciable sur le plan des effets indésirables.

d. Thérapeutiques immunomodulatrices

Certains traitements immunomodulateurs sont utilisés depuis de nombreuses années, seuls, en association avec les ISA conventionnels, ou aux traitements déplétant les lymphocytes B. La dapson, avec sa capacité à interférer avec les chimio-attractants des polynucléaires neutrophiles, est utilisée dans certaines formes de peu sévères de pemphigus présentant un infiltrat à prédominance de neutrophiles (PS, pemphigus à IgA, pemphigus herpétiforme) (148,343). D'autre part, la dapson est parfois utilisée comme traitement adjuvant à visée d'épargne stéroïdienne chez certains patients ayant un pemphigus (344).

L'administration d'immunoglobulines intraveineuses polyvalentes (IgIV), à raison d'administrations de 2 g/kg/mois répartis sur plusieurs jours, a démontré son intérêt dans l'obtention du contrôle de la maladie chez des patients ayant un pemphigus récalcitrant (345), en association à la corticothérapie ou au RTX (346). Le traitement initial par IgIV élève rapidement les taux d'Ig circulants totaux, ce qui stimulerait les processus homéostatiques de catabolisme des anticorps, entraînant une baisse des taux sériques d'anticorps d'IgG1 et d'IgG4 anti-Dsg 1 et Dsg3 (347). L'association du RTX et des IgIV peut être efficace pour le traitement des cas de pemphigus réfractaires, permettant l'obtention de rémissions complètes persistantes au long cours (348) ; cette association IgIV et RTX est actuellement évaluée dans un essai clinique chez les patients atteints de pemphigus modéré à sévère (NCT04400994).

L'immunoabsorption, qui élimine également rapidement les IgG anti-Dsg de la circulation, a également été testée en association aux traitements immunosuppresseurs conventionnels et au RTX

(349,350). Son utilisation est cependant limitée à quelques équipes spécialisées, essentiellement en Allemagne. La technique d'immunoabsorption actuelle élimine les immunoglobulines de manière non spécifique augmentant ainsi le risque infectieux; des études sont en cours pour développer une adsorption éliminant spécifiquement les anticorps anti-Dsg (351).

e. Nouvelles approches thérapeutiques

Au fur et à mesure des avancées concernant la pathogenèse du pemphigus et l'implication de d'acteurs immunologiques circulants ou infiltrant les tissus lésés, de nouvelles approches thérapeutiques ciblant ces acteurs, ces molécules ou ces axes ont été développées, permettant d'ambitionner l'obtention de rémissions chez des patients résistants aux premières lignes thérapeutiques ainsi qu'un meilleur profil de tolérance.

- **Traitements locaux**

La découverte de structures ectopiques lymphocytaires au sein du derme des zones lésées de pemphigus a renforcé l'intérêt de développer des thérapeutiques locales. L'administration intralésionnelle de RTX, déjà utilisée dans le traitement de certains lymphomes, a été permis de traiter quelques patients ayant des lésions de pemphigus touchant la cavité buccale et du cuir chevelu réfractaires aux traitements conventionnels (352). Ces injections intralésionnelles de RTX ont par ailleurs démontré leur non-infériorité par rapport aux injections locales de corticoïdes retard dans le traitement des lésions de PV réfractaires (353). Ces traitements permettraient de cibler les ELS mises en évidence dans le pemphigus, qui pourraient être responsables de la persistance d'activité locale dans ces lésions réfractaires. L'identification de la composition cellulaire et l'exploration de l'impact de l'injection de stéroïdes dans les lésions de patients atteints de pemphigus qui abritent des agrégats lymphoïdes sont en cours d'étude (NCT04509570). Dans le cas des injections intralésionnelles de RTX, l'attribution à un effet strictement local ne peut être cependant retenue compte tenu de la mise en évidence d'une déplétion périphérique des LB, identique à celle d'injections intra-veineuses, lors des injections locales (352).

- **Thérapeutiques visant à dépleter les LB**

Certaines approches novatrices ciblent des obstacles spécifiques dans les contextes thérapeutiques actuels. Visant à restaurer l'efficacité du traitement anti-CD20 chez les patients sous rituximab atteints de HACA, l'injection sous-cutanée d'ofatumumab, un anticorps IgG1 anti-CD20 entièrement humain avec une affinité de liaison accrue pour le CD20, a été testée avec succès chez plusieurs patients atteints de PV (354), mais un essai thérapeutique de phase II a été arrêté par le sponsor pour des raisons commerciales. De même, le veltuzumab, un anticorps anti-CD20 humanisé de deuxième génération, a été utilisé avec succès dans un cas de PV réfractaire au RTX (355). Le développement d'anticorps anti-CD20 de deuxième et troisième générations, possédant des capacités de liaison au CD20 plus

importantes que le RTX, induisent une déplétion des LB plus importante en augmentant l'ADCC (356). Ces nouveaux anti-CD20, tels que l'obinutuzumab, pourraient représenter une avancée importante dans le traitement des patients ayant développé des réactions immunoallergiques au RTX ou une perte d'efficacité avec le RTX.

Des mAb anti-CD19, tels que l'inebilizumab, existent et permettrait de cibler toutes les sous-populations lymphocytaires B, notamment les LLPCs et les LB mémoires exprimant faiblement CD20 qui ne sont pas déplétés par le RTX. Ces traitements déplétant les cellules CD19+ n'ont cependant pas été utilisés dans le pemphigus, notamment du fait d'un risque d'immunosuppression et d'effets indésirables plus important.

La déplétion des LB, notamment des formes matures tels que les LB mémoires et/ou plasmocytes peut aussi passer par l'inhibition de facteurs solubles impliqués dans leur prolifération et leur survie. Une étude a mis en évidence une modification de l'axe BAFF/récepteur de BAFF chez les patients atteints de pemphigus et qui pourrait intervenir dans les rechutes après traitement par corticothérapie (357). Ainsi des traitements ciblant BAFF (belimumab, un mAb humanisé anti-BAFF) ou APRIL (atatacept, protéine de fusion recombinante inhibant BAFF et APRIL) et qui ont démontré leur efficacité dans d'autres maladies auto-immunes (358,359), pourraient avoir un intérêt dans le traitement du pemphigus. Un traitement par anticorps monoclonal anti-BAFFR est actuellement testé dans une étude de phase II (NCT01930175)

De nouvelles thérapies développées dans les hémopathies lymphoïdes B, et ciblant des voies de signalisation permettant la survie des LB, telles que les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton (BTK), sont également apparues comme une option thérapeutique potentielle dans le pemphigus. Les inhibiteurs de BTK (BTKi) semblent être capables de neutraliser les auto-anticorps pathogènes, d'inhiber la production de nouveaux auto-anticorps et de posséder des effets anti-inflammatoires. Un essai impliquant l'utilisation d'un BTKi, le rilzabrutinib (PRN 1008), chez des patients atteints de PV (NCT02704429) a été achevé et récemment publié (360). L'étude suggère que l'inhibition de la BTK peut être une stratégie de traitement prometteuse.

- **Thérapeutiques visant à déléter les auto-anticorps**

Certains traitements visant le même objectif que celui des IgIV ont été développés compte tenu du prix important et des difficultés de production de ces dernières. Des anticorps ayant une affinité élevée pour le FcRn ont ainsi été développés pour inhiber la fonction de cet acteur clé dans le niveau d'IgG circulantes et leur fonction (65). Les thérapeutiques ciblant le FcRn visent à bloquer la liaison des IgG et des complexes immuns d'IgG au FcRn, accélérant ainsi leur dégradation et induisant une réduction des taux plasmatiques globaux d'IgG, y compris d'auto-anticorps pathogènes (361). Les données d'une

étude de phase 1b/2a utilisant un anticorps monoclonal humanisé IgG4-kappa à haute affinité pour le FcRn (ALXN1830), avaient montré une réduction importante et rapide des symptômes cliniques cutané et muqueux chez les patients ayant un pemphigus, avec un profil de sécurité et de tolérance acceptable (344). L'amélioration clinique était associée à une diminution des taux d'IgG totales, des complexes immuns d'IgG, et des auto-anticorps anti-Dsg sans affecter les taux d'IgA et d'IgM. Un autre traitement anti-FcRn est également à l'essai dans le pemphigus ; il s'agit de l'efgartigimod, un fragment Fc d'un anticorps IgG1 humain modifié pour avoir une affinité accrue, un ligand naturel du FcRn, qui a été modifié pour avoir une affinité accrue avec le FcRn par rapport à l'IgG endogène (362). Un essai de phase 2 évaluant l'efgartigimod chez des patients atteints de PV ont montré une efficacité rapide pour contrôler la maladie et obtenir des rémission complète chez 64% des patients, ainsi qu'un profil de tolérance acceptable (363). Deux essais de phase 3 évaluant une formulation sous-cutanée d'efgartigimod chez des patients atteints de pemphigus sont en cours (NCT04598451 et NCT04598477).

En se concentrant sur les SNP décrits comme associés au pemphigus, Assaf S *et al.* ont récemment démontré que le ST18 contribuait à la déstabilisation de l'adhésion cellule-cellule d'une manière dépendante du TNF- α , ouvrant la discussion quant à l'évaluation des inhibiteurs du TNF- α dans le traitement du pemphigus (364).

- **Thérapeutique visant à dépléter les LB autoréactifs**

Récemment, la technologie des CAR (chimeric antigen receptor) T cell a révolutionné les possibilités d'immunothérapie du cancer (365). Cette approche utilise des LT provenant du sang du patient qui sont génétiquement manipulées en laboratoires de recherche pour exprimer un CAR capable de reconnaître un type cellulaire spécifique exprimant de manière unique un antigène cible. Dans le cas du pemphigus, les chercheurs ont développé des récepteurs d'auto-anticorps chimériques (CAAR), fusionnant le domaine extracellulaire de Dsg3 et les domaines de signalisation CD137-CD3 ζ , afin de générer des CAAR T-cells qui reconnaissent les BCR spécifiques de Dsg3 des LB autoréactifs pour induire leur élimination (366). L'intérêt majeur des cellules CAAR-T est de cibler les LB autoréactifs, notamment les LB mémoires, impliqués dans la non-réponse et les rechutes après traitement par RTX, mais aussi de réduire les risques liés à l'immunosuppression compte tenu de la sélectivité de la déplétion. Une étude préclinique sur des patients atteints de PV a démontré que ces DSG3-CAAR T-cells permettaient de détruire spécifiquement les LB autoréactifs anti-Dsg3, responsable d'une diminution des auto-anticorps circulants du sérum et déposés dans la muqueuse (367). Un essai clinique de phase 1 visant à déterminer la dose maximale tolérée de Dsg3-CAAR T-cells chez les patients atteints de PV à dominante muqueuse est en cours (NCT04422912).

Bien qu'il s'agisse d'une technique prometteuse, l'efficacité des thérapies par Dsg3-CAAR T-cells dans le pemphigus pourrait être limitée par le fait de ne cibler qu'un seul antigène cible des auto-anticorps sous une conformation donnée. Ainsi, d'autres clones B autoréactifs pathogènes ne seraient pas éliminés et pourrait maintenir l'activité de la maladie. Le répertoire de reconnaissance de ces CAAR T-cells nécessitera peut-être d'être élargi dans de futurs essais, notamment par l'utilisation de cellules CAAR-T contenant deux domaines ciblant chacun un BCR-spécifique d'un antigène cible.

5. Objectifs de la recherche dans le pemphigus

Alors que certaines thérapeutiques, telles que le RTX, ont démontré une efficacité importante, le maintien de cette rémission complète dans le temps nécessite souvent des réinjections ultérieures ou séquentielles avant d'atteindre une rémission complète sans traitement. L'identification de marqueurs biologiques permettant d'identifier les patients, qui nécessiteront un traitement plus intensif ou prolongé, est important pour limiter les coûts mais aussi le fardeau en lien avec la maladie et les effets indésirables en lien avec les traitements.

Dans la PR ou le LES, une moins bonne réponse au RTX a été associée à la présence de sous-populations de LB plus résistantes à la déplétion par anticorps monoclonal anti-CD20 ; notamment la présence d'un pourcentage important de LB mémoires switchés, qui sont plus fréquemment CD20^{faible} (368,369). Après traitement par RTX, dans le pemphigus, plusieurs marqueurs cellulaires ont été associés à la rémission : temps plus long avant la repopulation par les LB, ratio LB naïfs/mémoires augmenté, proportions importantes de LB transitionnels CD38⁺⁺CD24⁺⁺, de Breg, mais aussi de LB autoréactifs anti-Dsg3 de répertoire polyclonal (95,369,370). D'autres part, des marqueurs moléculaires circulant ont montré leur association au risque de rechute : anticorps anti-Dsg avant traitement et après traitement (369,371), taux de BAFF circulant (372). Ainsi, les recommandations européennes intègrent le taux initial et le suivi du taux d'anti-Dsg circulantes dans l'indication à des injections de RTX à visée de maintenance (101). Ces recommandations permettent une homogénéisation des pratiques, cependant la recherche d'autres marqueurs pour affiner les protocoles thérapeutiques reste un objectif important dans le pemphigus.

Ainsi, afin de rechercher les mécanismes moléculaires sous-tendant l'activité auto-immune des LB dans le pemphigus, nous avons mené au cours de cette thèse en coopération avec le Dr Baptiste Janela (Skin Research Institute of Singapore, Singapore) des analyses de spectrométrie de masse, de RNAseq et de sc-RNA-seq sur les LB de patients ayant un pemphigus, avant et après traitement, et sur des individus sains. Ces analyses, présentées dans les résultats de ce manuscrit, faisaient ressortir CD83 comme un marqueur d'intérêt de l'activité immunologique des LB dans le pemphigus.

E. CD83

1. Généralités

Le CD83 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, appartenant à la superfamille des Ig, codée par un gène unique composé de 5 exons, localisé sur le chromosome 6p23 chez l'humain (373,374). Décrit initialement à la surface des DC activées (375,376), le CD83 est maintenant reconnu comme un marqueur exprimé à la surface d'un large spectre de cellules immunitaires des mammifères.

La protéine CD83 humaine comprends 205 acides aminés hautement glycosylés et a un poids moléculaire de 45 kDa (373,377). Le CD83 est composé d'un domaine intra-cellulaire C-terminal codé par l'exon 5, d'un domaine transmembranaire codé par l'exon 4 et d'un domaine extracellulaire codés par les exons 2 et 3 (373). Le gène codant CD83 et l'architecture protéique de cette glycoprotéine est conservée parmi les espèces, supportant un rôle important, avec notamment une homologie de 63% de la séquence d'acides aminées entre souris et humain ; la différence portant sur des réductions du nombre d'acides aminés de la partie intracellulaire chez la souris (375). La régulation transcriptomique de ce gène est sous la dépendance de facteurs de transcription classiquement retrouvés dans les cellules immunitaires (NFkB et IRF), mais aussi du récepteur d'aryl hydrocarbène, impliqué dans la détection des toxiques environnementaux (378,379).

Les études de cristallographie ont montré que la structure tertiaire de CD83 comporte un domaine extra-cellulaire de type V similaire aux Ig, contenant 5 résidus cystéines formant des ponts disulfure (377,380). Deux isoformes différentes de CD83 sont décrites, une forme membranaire (CD83m) et une forme soluble (CD83s), qui présentent des fonctions biologiques différentes (381). Le CD83m s'associe sous forme d'homodimère ou d'homotrimère alors que le CD83s serait monomérique dans le milieu extra-cellulaire (377,378,382) (**Fig. 21**). Le domaine intra-cellulaire de CD83 n'a pas de motif intracellulaire permettant de suggérer une action de transduction de signal, il agirait donc par des interactions hétérotypiques en recrutant d'autre protéines membranaires de la famille des Ig ou de la membrane (378).

Les partenaires de CD83 membranaire (CD83m) et ses fonctions exactes restent incertaines dans de nombreux types cellulaires malgré son rôle clé dans la régulation du système immunitaire par son activité sur plusieurs types cellulaires (383).

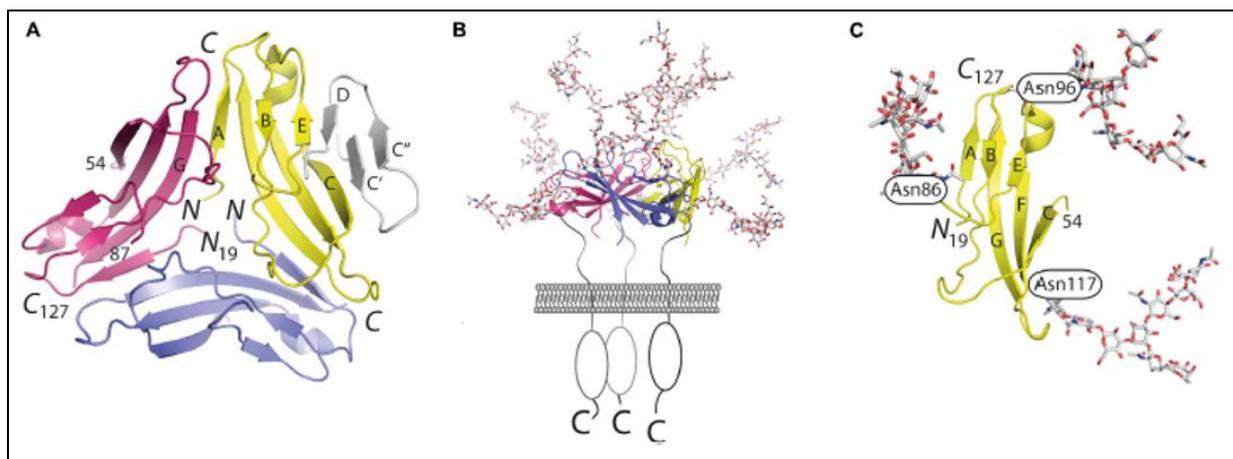


Figure 21. Modélisation de la structure de CD83 sous forme homotrimerique à la surface membranaire (A, B) et sous forme monomérique soluble (C) (provenant de Grosche et al, Front Immunol, 2020 (378)).

2. CD83 membranaire

L'expression de CD83m a été rapportée sur différents types de cellules immunitaires activées dont elle est absente au repos (384–386). Son expression a d'abord été rapportée sur les DCs matures, incluant les LC (373,375), puis sur un large panel de cellules immunitaires dont les LB (384), les LT dont les Treg (387), les macrophages/monocytes et les neutrophiles (376,388), certains lymphocytes NK régulateurs (389) et par les TECs (390).

CD83m joue un rôle important dans la présentation antigénique, l'activation et la survie des cellules immunitaires. Cette importance est soulignée par l'expression de CD83m par certaines lignées lymphoblastiques transformées par l'EBV et certaines hémopathies lymphoïdes, favorisant leur survie (391). Les mutations somatiques du gène de CD83 sont fréquentes dans les lymphomes B à grandes cellules (385). Dans d'autres cancers, l'expression génique de CD83 par l'infiltrat cellulaire péri-tumoral a été associé à des environnements aux fonctions immunosuppressives responsables de mauvais pronostic mais répondant mieux aux inhibiteurs de checkpoint immunitaires (392).

a. CD83m et DC

Le CD83m est un marqueur important permettant de différencier les DC matures. Sa fonction biologique précise reste cependant débattue. Les données des différents modèles murins inactivant ou surexprimant le CD83 de manière non-spécifique à une lignée cellulaire ont montré que CD83m impacte la présentation antigénique des DCs en modulant l'adressage à la membrane des molécules du CMHII et de CD86 à partir d'endosomes (378). La perte de CD83, responsable d'une diminution de l'expression de CMHII et de CD86, engendre des DCs au phénotype très activé augmentant la protection contre les bactéries pathogènes mais favorisant l'auto-immunité (378). Sur un modèle de souris CRE-LoxP

permettant la suppression de CD83 spécifiquement sur les DCs, Wild *et al* ont montré que les profils de production cytokinique et de marqueurs membranaires de costimulation des DC étaient modifiés, responsables d'une induction plus importante des réponses T effectrices antigène-dépendantes et d'une diminution de la fonction suppressive des Treg (393).

b. CD83m et lymphocytes T

Un des rôles majeurs de CD83m est son intervention dans la sélection positive normale de LT CD4+ thymiques. En effet, l'absence/diminution de CD83 sur modèles murins KO/mutés est responsable d'une réduction très importante des LT CD4+ thymiques et circulants, sans affecter les autres thymocytes (394). Ces anomalies ne sont pas liées à l'expression endogène de CD83m par les LT CD4+ ; des modèles murins ayant montré que les LT CD4+ CD83^{-/-} présentaient un développement normal (395). Cette diminution des LT CD4+ thymiques et circulants est lié à un dysfonctionnement des TECs, qui en l'absence d'expression de CD83m ne peuvent inhiber MARCH-8, une ubiquitine ligase, et ainsi ne peuvent pas stabiliser le CMHII nécessaire à leur fonction de sélection (394).

D'autre part, certaines sous-populations lymphocytaires T non régulatrices expriment faiblement CD83m après avoir été en contact avec les APC après captation du CD83m par trogocytose (385). Pour les Treg, l'expression de CD83m est nécessaire à leur différenciation et à leur stabilité (378,395). L'expression de CD83m apparait rapidement, uniquement sur les populations Treg de souris, et la surexpression de CD83 dans des LT CD4+ activés induit un phénotype Treg (395). Chez l'humain, l'expression de CD83m apparait rapidement après l'induction et l'expansion des Treg *in vitro* et la différenciation de LT CD4+ induite par le TGF- β fait apparaitre un phénotype Treg avec une expression de CD83m stable dans le temps alors que son expression diminue très rapidement chez les LT CD4+ totaux stimulés par le TCR (396). Sur des modèles murins inactivant CD83 de manière globale, il a été montré que les Treg CD83^{-/-} se développaient normalement mais changeaient leur production cytokinique pour produire des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-1B, IL-5) (378).

Ces résultats ont été confirmés dans l'étude de Liedtke *et al* (397) qui a utilisé un système CRE-LoxP permettant la délétion spécifique du gène de CD83 dans les sous-populations de LT de souris BALB/c. Leurs résultats confirmaient que i) le CD83 endogène n'était pas nécessaire au maintien de l'activité immunosuppressive des Treg; ii) les LT CD4+ conventionnels, déficients en CD83, stimulés *in vitro* avaient une capacité plus importante de prolifération et de polarisation vers des profils Th1 et Th17 pro-inflammatoires; iii) la délétion de CD83 des LT entraînait une aggravation des réactions d'hypersensibilité de contact associé à une activation plus importante des LT CD4+ ; iv) sur modèle murin de colite inflammatoire, cette délétion aggravait la maladie en lien avec une augmentation de marqueurs d'activation des DC, confirmé par la coculture de LT CD83^{-/-} et de DC.

Ainsi, CD83m semble avoir un rôle important dans la stabilité et la fonction tolérogène des Treg mais aussi dans la régulation de l'activation des LT effecteurs pro-inflammatoires, notamment par leur régulation de l'interaction avec les DC matures.

c. CD83 membranaire et lymphocytes B

- Expression de CD83 sur les lymphocytes B

L'expression de CD83m par les LB a initialement été mise en évidence sur des cellules de lignées de LB immortalisés en culture, notamment lors de leur prolifération (373). Hors lignées, le CD83 est exprimé par les LB immatures après le stade pré-B, une fois qu'ils expriment un BCR fonctionnel (383,398). Il est ainsi exprimé à des taux faibles par les LB au sein des centres germinatifs médullaires et des organes lymphoïdes secondaires (373,383). Au sein des centres germinatifs, CD83m est exprimé par les centrocytes de la zone claire en cours de processus de sélection et de commutation isotypique (399).

Dans le sang, les LB des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) n'expriment pas le CD83m de manière basale ; son expression est augmentée lors de culture de PBMC en présence d'activateurs (373,375). Suite à l'activation des TLR in vitro de PBMC humaines, les diverses sous-populations matures de LB (naïfs, mémoires switchés ou non) sont capables d'exprimer rapidement le CD83m (385) ; l'expression maximale étant atteinte en quelques heures après stimulation des TLR par le LPS ou le CPG, ou après engagement du BCR (383,400,401). Cette expression membranaire rapidement inductible après stimulation est liée à une importante activité du promoteur du gène de CD83 dans les LB des organes lymphoïdes, qui est conservée par les différentes sous-population de LB périphériques (402). Cette activation du promoteur est responsable d'une production rapide de CD83m de novo qui se mobilisera rapidement à la membrane en cas de stimulation des LB et par la mobilisation de stocks intracellulaires démontrés chez la souris (385,402). L'engagement du BCR est suffisant pour augmenter l'expression de CD83m ; l'addition de cytokines, tels que l'IL-4, ou de signaux de costimulation comme l'engagement de CD40 par un anticorps anti-CD40, permet d'augmenter cette régulation positive et de prolonger l'expression de CD83m par les LB (401). L'augmentation de CD83m par les LB suite à l'engagement du BCR par un antigène spécifiquement reconnu in vivo montre que malgré un profil d'expression faible sur les LB circulants, des sous-populations rares de LB pourraient présenter de hauts niveaux d'expression de CD83 en présence d'une stimulation antigénique spécifique (383).

Le CD83m est un marqueur d'activation des LB faisant suite à l'engagement du BCR ou des TLR mais aussi à l'interaction LB-LT (403). Sur un modèle de souris transgénique exprimant un BCR de spécificité connue, l'administration de l'antigène spécifique induit l'expression de CD83 sur 80% des LB de ganglions de la zone de drainage (403). L'expression de CD83 précède l'élévation de CD69, en faisant un marqueur précoce de l'activation (403). L'expression de CD83m par les LB nécessite un

contact physique LB-LT et l'induction d'expression de CD83m n'est pas médié par le complexe CMH/TCR mais dépend de l'interaction CD40/CD40L (403). D'autre part, certaines cytokines pourraient induire l'expression de CD83m par les LB. Ainsi, l'augmentation rapide et transitoire d'IL-10 associée à l'infection par *Plasmodium falciparum*, permet d'augmenter la survie des LB en favorisant des facteurs anti-apoptotiques associés à une augmentation du CMHII et du CD83 qui favoriserait l'interaction T-B, essentielle pour la survie des LB (404).

Plusieurs équipes de chercheurs ont établis des modèles murins ayant permis de montrer que CD83m est impliqué dans la régulation de la maturation des LB, leur homéostasie et leur fonction (400).

- **Maturation des lymphocytes B et CD83**

Certaines équipes n'ont pas trouvé d'anomalie du développement des LB sur des souris CD83 $-/-$, montrant des proportions des différentes sous populations de LB identiques aux souris sauvages (383). Cependant, d'autres équipes ayant utilisé différents modèles murins ont démontré l'implication de CD83 sur la maturation et la survie des LB (398). Des modèles de souris chimériques ont montré que le CD83m agirait comme un facteur de régulation de l'activation et de la maturation des LB (398,405). En effet, la surexpression de CD83 est responsable d'une accumulation de LB transitionnels et d'une réduction réciproque des LB matures folliculaires corrélé à la surexpression de CD83 (398). La surexpression de CD83 entrainerait notamment une absence de PC dans la moelle osseuse (400). La délétion de CD83 sur des souris KO diminuait la maturation des B de la zone marginale et augmentait la survie des LB périphériques (398,400).

Chez l'humain, l'expression génique de CD83 et de certaines polymérase permet la ségrégation du programme transcriptionnel des LB en 4 étapes régulant des mécanismes divergents de l'évolution du BCR mémoire suggérant l'importance de CD83 dans ce processus de maturation (406).

- **Fonction des lymphocytes B et CD83**

Les LB de souris CD83 KO ont des expressions membranaires basales diminuées de CMHII et de CD86, qui n'augmentent pas ensuite lors de la prolifération ou de la stimulation des TLR ou du BCR (407,408). La réduction d'expression de CMHII est liée à son internalisation ; les niveaux de transcription et de traduction intracellulaire ainsi que leur association dimérique étant conservés (401).

Dans un modèle de souris transgénique surexprimant CD83 sous un promoteur CMHI, les LB en culture *in vitro* présentaient une surexpression de CMHII et de CD86 indépendamment des conditions de stimulation (401). D'autre part, les LB de ces souris transgéniques montraient une réduction de la production d'Ig et une augmentation de la production d'IL-10 alors que les souris mutantes CD83 $-/-$ montraient réciproquement une augmentation de la production d'Ig et des taux réduits d'IL-10 (401). Alors que CD83 influe sur de nombreux types cellulaires, les changements de production d'Ig et d'IL-

10 étaient en lien direct avec la modification d'expression de CD83 sur les LB car elles étaient reproduites sur des LB triés en culture (401). In vivo, ces souris transgéniques montraient un défaut de la réponse humorale avec une production réduite d'Ig lors de la stimulation par des antigènes T-dépendants ou T-indépendants (400). Des modifications de réponse humorales identiques aux résultats obtenus sur souris transgéniques ont aussi été mises en évidence dans d'autres espèces animales (409). Sur souris transgéniques surexprimant CD83, le CD83m a été colocalisé avec le BCR et le TLR-4, supportant son rôle de régulateur négatif de la survie des LB folliculaires via l'inhibition du signal induit par le BCR et la production d'IL-10 médiée par la stimulation du TLR-4 par les LB de la zone marginale (405).

D'autres éléments concernant le rôle du CD83m exprimé par les LB ont été mis en évidence sur un modèle de souris KO où seuls les LB étaient CD83^{-/-} (410). Ce modèle permettait de s'affilier des modifications immunologiques induites par la délétion de CD83 sur l'ensemble des cellules immunitaires, notamment la réduction du nombre de LT CD4⁺ qui peut influencer la maturation et la longévité des LB. Ces souris ayant des LB CD83^{-/-} ont confirmé l'impact de CD83 sur la maturation des LB au sein des centres germinatifs, mettant en évidence une réduction de la zone marginale, et l'impact négatif de la délétion de CD83 sur l'expression du CMHII et de CD86 (410). Cette dernière fonction étant liée à la régulation de l'ubiquitine ligase MARCH-1 par CD83 sur les LB, comme sur les DC (411). Ces LB déficients en CD83 montraient une augmentation des capacités de prolifération et de sécrétion d'IL-10 après stimulation par le CPG (410). Cependant, lors de la stimulation antigénique bactérienne, il n'y avait pas de changements des taux d'IgM et d'IgG mais une augmentation des IgE, suggérant une action sur la polarisation vers la voie Th2 (410).

Le CD83m semble donc avoir un rôle complexe dans la promotion de la maturation et de la survie des LB. Bien que causant une augmentation de molécules de costimulation par les APC, nécessaires à l'activation des LT, l'effet de la signalisation via CD83m semble mener sur les LB comme sur les DC à des fonctions de régulations de l'immunité. Ainsi, l'injection d'un anticorps polyclonal anti-CD83 sur modèle murin associé à un engagement simultané du BCR était associé sur modèle murin à une augmentation des IgG1 spécifiques de l'antigène alors que les autres isotypes n'étaient pas affectés (412). Cette même équipe a montré sur modèle murin qu'un anticorps anti-CD83 ne changeait pas la prolifération des plasmablastes générés par lors d'une immunisation T-indépendante mais augmentait le taux d'IgG1 et la fréquence des plasmablastes producteur d'IgG1 qui proviennent de zones marginales (413). Ces résultats suggèrent qu'interférer avec CD83 au moyen d'un anticorps anti-CD83 peut influencer sur le switch isotypique des LB de la zone marginale et ainsi augmenter la production d'anticorps (413).

Certaines équipes ont développé des anticorps anti-CD83 visant à dépléter spécifiquement les cellules exprimant CD83 en vue de traiter certaines hémopathies (**Tableau 5**). D'autres équipes ont utilisé des anticorps anti-CD83 pour dépléter les CPA exprimant CD83m afin de réduire l'activation et

la prolifération des LT allo-réactifs afin de prévenir les rejets de greffe. Une de ces équipes a développé des anticorps monoclonaux anti-CD83 (clone 3C12C), défucosylés afin d'augmenter leur capacité à induire l'ADCC des DC CD83+ (414). Dans un modèle de xénogreffe de PBMC humaines, cet anticorps permettait de réduire les réactions de rejet ; sur des PBMC allostimulées, cet anticorps entraînait aussi une déplétion des LB CD83+ sans causer de déplétion pan-B totale et une inhibition de la réponse humorale avec une baisse importante de la production d'IgG et d'IgM (414).

3. Partenaires de CD83

Bien que le CD83s puisse se fixer au LB murins, aux DC humaines et aux LT CD8+, aucune étude s'attachant à étudier la fixation de CD83s n'a permis d'identifier spécifiquement un ligand ou un récepteur au CD83m (415–417). Certaines études ont montré la nécessité d'organisations quaternaires en multimères pour que le CD83s puisse se fixer aux cellules immunitaires, notamment sous forme de dimères pour les DC (416) ou de dodécamères pour les LT (417). Ainsi, le CD83m de certaines cellules immunitaires activées pourrait se lier principalement par des interactions homotypiques au CD83s, permettant le recrutement d'autres CD83m, ou aux CD83m exprimé par d'autres cellules (418). Cependant, ces hypothèses ne sont pas prouvées à ce jour. Vu que la partie intracellulaire de CD83m n'est pas connue pour disposer de motif de transduction, CD83m agirait comme une protéine recrutant d'autres acteurs membranaires participant à la signalisation intra-cellulaire (378). Malgré l'absence de motifs de transduction, Kretschmer *et al* ont démontré sur des modèles murins que la surexpression de CD83 était responsable d'une réduction de la signalisation calcique lors de la stimulation par anti-BCR des LB qui n'était pas mise en évidence lors de la stimulation par anti-CD3 des LT (401)

Longtemps, aucun partenaire de CD83m n'avait été confirmé. Récemment, le domaine transmembranaire de CD83m a été montré comme interagissant avec des E3-ubiquitine-ligases de la famille de MARCH qui participent à réguler la stabilité du CMHII et de CD86 exprimé par les CPA, au sein de TECs, des DC et des LB. D'autre part, dans les DC, CD83 se lie à GRASP55, une protéine de transport du Golgi cruciale dans la glycosylation et dans l'expression à la membrane du CD83 (419). Plusieurs travaux ont d'ailleurs montré que les anticorps anti-CD83 et le CD83s entraînait une modulation de la signalisation calcique intracellulaire des DC et entraînait un réarrangement du cytosquelette (420).

Concernant le CD83s, il a été montré que les monocytes, qui n'expriment pas CD83m de manière basale, sont rendus tolérogènes par la liaison de CD83s à MD-2 (myeloid differentiation factor-2), un corécepteur du complexe de signalisation du TLR 4, en diminuant les capacités ultérieures de signalisation par la voie du TLR, suite à une déplétion d'IRAK-1 (421). D'autre part, CD83s pourrait se lier à CD154 sur les LT Th2, entraînant leur mort suite à la répression de l'inhibiteur d'apoptose Bcl2L12 (422).

4. CD83 soluble

Le CD83s est produit par les DC activées et par les LB, qui en serait le principal producteur (**Fig. 22**) (381). Il serait produit par clivage membranaire de la portion extra-cellulaire de CD83m ou à partir d'un épissage alternatif (418). Il peut être détecté à des niveaux faibles chez les donneurs sains humains, variables entre 125 pg/mL et 500 ng/mL en fonction des différents kits ou ELISA maison utilisés (374,381,423). Son taux a été montré comme augmenté dans certains lymphomes où il a un intérêt comme marqueur des cellules tumorales et comme biomarqueur de la progression de la maladie (418), mais aussi dans d'autres cancers tel que le mélanome (424).

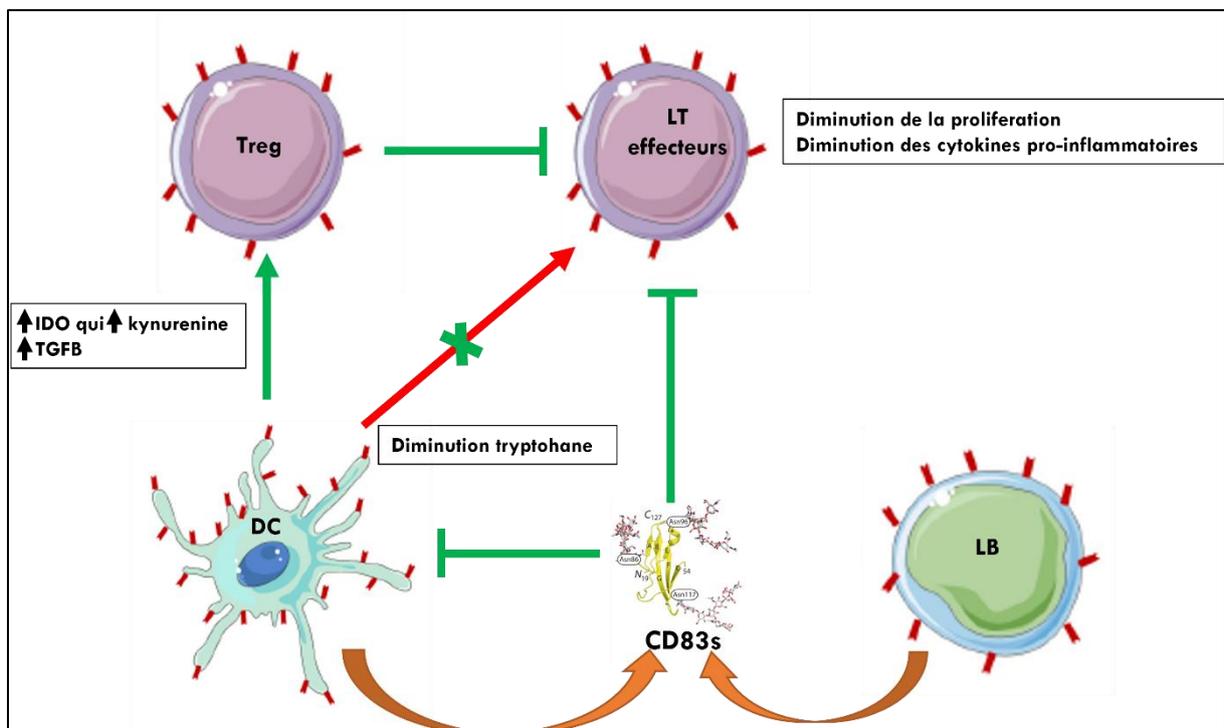


Figure 22. Représentation schématique du mode d'action de CD83s.

5. CD83 et maladies auto-immunes/inflammatoires

Le CD83 joue un rôle crucial dans la modulation de réponse immunitaire au non-soi, notamment dans la lutte infectieuse antibactérienne ou virale (378). De nombreux virus modulent l'expression de CD83m par les cellules immunitaires pour favoriser leur survie en la diminuant, comme les virus du groupe Herpès sur les DC, ou en l'augmentant comme l'Epstein Barr virus sur les LB (378). Il n'est ainsi pas surprenant que plusieurs études aient fait suspecter son implication dans certaines maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque, le LES, la PR ou les uvéites auto-immunes (425).

Dans les maladies auto-immunes et inflammatoires, les études portant sur l'expression de CD83m par les cellules immunitaires sont peu nombreuses et les résultats de comparaison des taux de CD83s circulant des patients aux donneurs sains sont divergents, montrant des taux augmentés dans certaines maladies comme la PR et des taux diminués dans d'autres, comme dans la sclérose en plaque (426–428). Dans la PR, les taux sériques de CD83s ne sont pas modifiés par le traitement anti-TNF- α , allant contre un potentiel de biomarqueur d'activité dans la PR (427). Cependant, des données de RT-qPCR du sang périphérique comparant les patients PR répondeurs ou non à l'abatacept, un traitement inhibant l'activation des LT en bloquant le CD80 et le CD86, ont mis en évidence des niveaux d'expression génique augmenté de CD83 avant traitement et 6 mois après traitement chez les répondeurs (429). Dans le diabète juvénile, le CD83s est diminué par rapport aux individus sains et inversement corrélé aux taux d'HbA1c et au risque de complications au long cours de la maladie (430). Dans des pathologies chroniques immuno-allergique, le CD83s sérique est diminué par rapport aux individus sains chez les patients ayant une rhinite allergique ou une allergie alimentaire (422,431). Dans ces pathologies, le taux de CD83s présentait une corrélation négative avec les IgE spécifiques et les niveaux de cytokines Th2, respectivement (422,431). D'autre part, sur certains modèles murins, notamment d'uvéite auto-immune, les taux de CD83s augmentent pendant la phase de rémission de la maladie (432).

L'expression de CD83m par certaines classes PBMC circulantes a été étudiée dans le LES mettant en évidence une augmentation de l'expression de CD83m par les monocytes et une diminution de l'expression de CD83m par les DC myéloïdes en comparaison aux individus sains (433,434).

Au niveau des tissus lésés, des taux élevés de CD83s ont été détectés dans la synoviale humaine de patients ayant une PR (428). Dans un modèle murin de colite inflammatoire, de très nombreux leucocytes CD83+ infiltrent le tube digestif inflammatoire et les cellules muqueuses relarguent une quantité importante de CD83 lors de l'apparition de la maladie (435) ; ces modèles murins ont notamment montré que l'expression de CD83 par les DCs, les LT CD4+ et CD8+, les Treg et les LB jouaient un rôle essentiel dans la régulation de l'inflammation intestinale (435,436). D'autres équipes ont montré l'expression de CD83m par d'autres épithéliums lésés. En 2021, Mo LH et al ont montré que les cellules épithéliales des voies aériennes d'un modèle de rhinite allergique de souris exprimaient CD83m, dont l'expression était majorée par la stimulation par CD40L (437). A ce jour, les données concernant CD83m/CD83s dans les maladies auto-immunes/inflammatoires à expression dermatologique sont peu nombreuses. Il a cependant été montré que certains types cellulaires, tels que les DCs, infiltrant le derme ou l'épiderme pouvaient exprimer CD83m dans le LES, la dermatomyosite et le psoriasis (438,439).

Ainsi, des traitements visant à modifier l'activité du couple CD83m/CD83s ont été développés pour cibler les cellules surexprimant CD83m ou pour modifier le taux de CD83s afin de réduire l'activité de modèles d'allo-immunité, d'auto-immunité et de maladies inflammatoires. De nombreuses études

utilisant des protéines de CD83s recombinantes (protéines de fusion CD83-Fc ou CD83 porteur de résidus histidine) ont montré le potentiel inhibiteur du CD83s dans la maturation des DC (440) et dans l'activation et la prolifération des LT médiée par les DC (416). L'injection de CD83s recombinant a montré qu'il permettait de réduire l'inflammation et les symptômes de la maladie dans divers modèles murins de colite inflammatoire, d'arthrite auto-immune, de LES, de sclérose en plaque et de rhinite allergique (**Tableau 5**). Sur ces modèles, le CD83s influait notamment sur les DC, favorisant leur caractère tolérogène, réduisait l'activité des LT effecteurs autoréactifs et favorisait l'induction de Treg (435,441).

Thérapie	Indication	Modèle	Mécanisme	
Ac anti CD83	Réaction du greffon contre l'hôte	PBMC humaines (allostimulation) Souris	Déplétion des DC CD83+ (442,443)	
	Artérite granulomateuse	Souris chimérique	Déplétion des DC CD83+ (444)	
	Arthrite collagène	Souris	Déplétion des DC CD83+. Induction de Treg (445)	
Ac anti-CD83 +/- conjugaison à chimiothérapie	Biomarqueur et cible thérapeutique du lymphome Hodgkinien	Cellules tumorales et sérums humains	Déplétion des LB tumoraux CD83+ et neutralisation du CD83s circulant (391).	
CD83s recombinant	Transplantation d'organe solide			
	Cutanée	Souris	Inhibition de la prolifération des LT du receveur, de la production d'IL-2 et d'IFN- γ (446)	
	Rénale	Souris Rat	Induction de DC tolérogéniques Diminution des LT et monocytes infiltrant le greffon et des cytokines pro-inflammatoires (447,448)	
	Cornée	Souris	Induction de Treg (449) Induction de DC et de macrophages tolérogènes (450)	
	Cardiaque		Réduction des DC allogéniques par atténuation de leur maturation et de leur fonction par réduction de l'expression de CMHII (451)	
	Maladies auto-immunes / immuno-allergiques			
	Sclérose en plaque	Souris	Réduction de la prolifération des LT et de la production d'IFN- γ (452)	
	MICI	Souris	Induction de DC tolérogéniques (435)	
	Uvéite auto-immune	Souris	Réduction des cellules NK Induction de DC tolérogéniques (453)	
	Lupus érythémateux systémique	Souris	Réduction des LT périphériques et des LB sécréteurs d'anticorps (454)	
	Polyarthrite rhumatoïde	Souris	Augmentation du nombre de Tregs (441)	
	Exosomes porteurs de CD83s	Rhinite allergique	Souris	Induction de Treg (437)

Tableau 5. Applications thérapeutiques en cours de développement ciblant CD83m et/ou utilisant CD83s.

OBJECTIFS

Objectif 1 : recherche de marqueurs membranaires différentiellement exprimés par les lymphocytes B circulants de patients ayant un pemphigus par CYTOF, RNA-seq et sc-RNA-seq en coopération avec le SRIS.

Objectif 2 : montrer l'expression de CD83 par les lymphocytes B circulant de patients ayant un pemphigus

2a. Comparaison de l'expression de CD83m des lymphocytes B au stade actif et en rémission du pemphigus en comparaison aux donneurs sains.

2b. Etude de la corrélation du taux de lymphocytes B CD83+ avec l'activité clinique et immunologique de la maladie.

Objectif 3 : montrer l'expression de CD83 par les lymphocytes B infiltrant la peau lésée de patients ayant un pemphigus

3a. Etude de la présence de structures lymphoïdes tertiaires ou de structures ectopiques lymphocytaires dans la peau lésée de patients ayant un pemphigus.

3b. Etude la composition des infiltrats lymphocytaires dermiques par immunohistochimie.

3c. Etude de la présence de lymphocytes B exprimant CD83 par co-immunofluorescence.

Objectif 4 : étude du CD83 soluble circulant sérique chez les patients ayant un pemphigus

3a. Comparaison du taux de CD83 soluble des donneurs sains et des patients avant et après traitement.

3b. Etude de la corrélation du taux de CD83s à l'activité clinique, à l'activité immunologique et à l'infiltrat dermique

Objectif 5 : étude de l'effet d'anticorps anti-CD83 sur la production d'immunoglobulines et d'anticorps anti-desmogléines par les PBMC de pemphigus.

MATERIEL ET METHODES

Echantillons humains

- **Echantillons sanguins**

Les PBMC utilisées dans les analyses de spectrométrie de masse, de RNA-seq et de single cell RNA-seq provenaient de patients de l'essai thérapeutique Ritux 3, du bras RTX (317).

Le sang de patients utilisé pour les expériences de cytométrie de flux et de stimulation de PBMC par anticorps anti-CD83 a été obtenu auprès de patients ayant un pemphigus dans le cadre d'un protocole de recherche interventionnelle (NCT04117529), promu par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), après obtention de la signature de consentement de participation au protocole. Cette étude monocentrique incluait des patients diagnostiqués et suivis au sein du service de dermatologie de l'hôpital Avicenne (AP-HP, Bobigny, France), centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes (MALIBUL). Les patients inclus avaient un diagnostic de pemphigus prouvé en histologie et en IFD. Les patients étaient inclus au diagnostic ou lors d'une rechute de la maladie avant instauration d'un traitement par RTX. En cas de rechute sous traitement, les patients ne devaient pas recevoir plus de 10 mg/j de corticothérapie orale, ni d'immunosuppresseurs conventionnels, et ne pas avoir reçu de traitement biologique dans les 12 mois précédents l'inclusion. Le protocole prévoyait un premier prélèvement de sang au stade actif de la maladie (T0) et un second prélèvement 6 à 12 mois après le traitement par RTX (T1, allongé à 18 mois suite à amendement du protocole).

Le sang de donneur sain provenait d'échantillons prélevés sur des donneurs anonymes de l'établissement français du sang (Hôpital Avicenne, AP-HP, Bobigny, France).

- **Echantillons biopsiques de tissus lésés**

Les analyses histologiques, immunohistochimiques et de co-immunofluorescence sur peaux et muqueuses de patients atteints de pemphigus ont été réalisées à partir de blocs provenant de la banque histologique du service de dermatologie, conservée dans le service d'anatomie pathologique de l'hôpital Avicenne (AP-HP, Bobigny, France). Les prélèvements biopsiques de patients avec un pemphigus ont été identifiés par une recherche dans la base informatique sur la période 2010-2020 grâce au système de codage des diagnostics histologiques. Les dossiers médicaux des patients identifiés ont été revus pour s'assurer : 1) que les patients avaient un diagnostic de pemphigus vulgaire ou superficiel confirmé par IFD et la présence d'anticorps anti-Dsg1 et/ou Dsg3 en ELISA ou en immunoblot, 2) que les biopsies avaient été réalisées à un stade clinique actif de la maladie. Les échantillons de patients ne souscrivant pas à ces critères d'inclusion ont été exclus. Les biopsies cutanées ou muqueuses avaient été conservées en bloc de paraffine après avoir été préalablement fixés en formaldéhyde.

- **Sérums de patients ayant un pemphigus**

Les sérums de patients ayant un pemphigus, étudiés pour les dosages de CD83s sérique, provenaient de patients pris en charge dans le service de dermatologie de l'hôpital Avicenne et conservés à -80°C dans le service d'Immunologie de l'hôpital Saint-Louis (AP-HP, Paris, France). Les patients incluables pour l'étude du CD83s sérique correspondaient à ceux inclus dans l'analyse histologique décrite ci-dessus. Parmi ces patients, seuls ceux ayant des échantillons de sérums disponibles dans la banque, non décongelés, prélevés sur la période 2010-2020, ont été inclus pour l'analyse du dosage sérique de CD83s.

Ces études, menées sur des échantillons tissulaires et sanguins déjà prélevés dans le cadre du soin, ont préalablement été autorisées par le comité local d'éthique du groupe hospitalier des Hôpitaux Universitaires Paris-Seine-Saint-Denis (CLEA-2020-156).

Isolement des PBMC et des lymphocytes B circulants

Les PBMC de patients ayant un pemphigus et de donneurs sains ont été isolées à partir de sang total, prélevé sur tube EDTA, par centrifugation sur gradient de densité (Ficoll).

Certaines analyses ont été menées sur des LB purifiés. Les LB étaient isolés des PBMC totales par tri cellulaire magnétique négatif à l'aide d'un kit selon les instructions du fabricant (B-cell isolation kit II®, Miltenyi Biotec, cat no. 130-091-151).

- **Conservation et utilisation des PBMC**

Les PBMC de patients du protocole Ritux3 utilisées pour les études de spectrométrie de masse, de RNA-seq, et de sc-RNA-seq avaient été congelées dans une solution de 90% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO).

Pour les autres expériences, une partie des PBMC de patients du protocole CarelyBP et de donneurs sains était utilisée pour l'étude par cytométrie de flux (FACS) de l'expression de CD83m et de marqueurs d'activation par les LB le jour même du prélèvement sanguin. Le reste des PBMC étaient utilisées en culture le jour même où congelées selon les besoins des expériences à mener. Dans ce dernier cas, les cellules étaient immergées dans une solution composée de 90% de SVF (Eurobio Scientific) et de 10% diméthyl sulfoxyde (Cat no. D2650, Sigma) puis congelées à -80°C en Coolcell® avant d'être transférées en azote liquide ultérieurement.

Cytométrie de masse, RNA-seq et sc-RNA-seq

Les analyses de cytométrie de masse par temps de vol (CYTOF), de RNA-seq et de sc-RNA-seq ont porté sur les LB CD19+, triés à l'aide d'un trieur, de 4 patients ayant un pemphigus à un stade actif, des

4 mêmes patients à 36 mois du traitement alors qu'ils étaient en rémission complète, et de 4 donneurs sains.

Concernant l'analyse par CYTOF, les LB CD19⁺ circulant ont été déposées dans des plaques 96 puis à fond rond (BD Falcon, cat. no. 3077), et lavés une fois avec 200 µL de tampon de cytométrie de flux (Tampon fluo : 4% SVF, 2 mM EDTA, 0.05% Azide dans du PBS 1x) puis marqué avec 100 µL de cisplatine 200 µM (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes sur glace afin d'exclure les cellules mortes. Les cellules étaient lavées à 2 reprises dans du tampon fluo et incubées avec le cocktail d'anticorps secondaires conjugués aux isotopes de métaux lourds pendant 30 minutes sur glace. Les anticorps utilisés provenaient de from Beckton Dickinson, BioLegend, eBioscience, BioXcell, R&D Biosystems, Abcam et AbD Serotec, et ciblaient CD1c, CD3, CD5, CD10, CD11b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD27, CD38, CD39, CD40, CD43, CD49d, CD56, CD95, CD148, CD162, IgD, IgM, IgG, IgA, BCMA, TACI, HLA-DR, GM-CSF, TNF- α , CXCR3, CXCR5, MR1, IL-6, IL-6R, IL-10, IL-10R α , FcRL4. Pour certaines marqueurs, des anticorps conjugués à la biotine ou à un fluorophore (phycoerythrine ou allophycocyanine) ont été utilisés comme anticorps primaires avant d'être marqués par des anticorps secondaires, conjugués aux métaux lourds, anti-fluorophore ou conjugués à la streptavidine. Les cellules étaient lavées deux fois avec du tampon fluo puis une fois avec du PBS avant d'être fixées avec 200 µL de paraformaldéhyde 2% (Electron Microscopy Sciences, cat. no. 15710) du PBS sur la suite. Après fixation, les cellules étaient centrifugées et resuspendues dans 200 µl de tampon de perméabilisation (BioLegend, cat. no. 421002). Les cellules étaient lavées une fois dans le tampon de perméabilisation puis une fois en PBS avant le barcoding par les codes-barres d'ADN. Afin de réduire les variations techniques, le mass-tag barcoding, qui permet l'acquisition de données de toutes les cellules en suspension aux différents temps durant l'analyse, a été utilisé. Une combinaison unique des codes-barres suivant a été utilisée pour marquer chaque échantillon pendant 30 minutes sur glace : BABE-Pd-102, DM-Rh-103, BABE-Pd-104, BABE-Pd-105, BABE-Pd-106, BABE-Pd-108, BABE-Pd-110 and BABE-Pd-113. Les cellules étaient ensuite lavées avec du tampon de perméabilisation puis avec du tampon fluo avant d'être marqué à température ambiante avec 250 nM d'iridium intercalant (DVS Sciences) dilué dans du PBS avec 2 % de paraformaldéhyde. Après 20 minutes, les cellules étaient lavées deux fois avec du tampon fluo puis avec de l'eau distillée avant d'être diluée à 0.5×10^6 cellules/mL dans l'eau. Les données ont été acquises et analysées grâce à une cytomètre de masse (Helios®).

Le détail complet des matériels et des méthodes utilisés par l'équipe du Dr B. Janela (SRIS) ne nous a pas encore été communiqué pour les analyses de RNA-seq et de sc-RNA-seq ; ces éléments seront ajoutés par les équipes du SRIS avant la publication.

Cultures cellulaires in vitro de PBMC

Après isolement, les PBMC ou les LB étaient mis en culture dans un milieu RPMI1640 - GlutaMAX™ (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF inactivé par la chaleur (Eurobio Scientific), pénicilline (100 UI/mL, Eurobio Scientific), streptomycine (100 µg/mL, Eurobio Scientific), HEPES (25 mM, Eurobio Scientific), en étuve à 37°C avec 5% CO₂.

Les PBMC et les LB étaient mises en culture à 1.10⁶/mL dans des plaques de 12 ou 24 puits à fond plat ou des plaques 96 puits à fond rond (Falcon®) en fonction des expériences. A J0, les cultures étaient laissées non-stimulées (Nil) ou étaient stimulées par l'ajout d'1 µg/mL d'anticorps polyclonal de lapin anti-CD83 humain (cat. no. HPA041454, Sigma), de gammaglobulines de lapin (code: 011-000-002, Jackson ImmunoResearch), d'anticorps monoclonal murin anti-CD83 humain (sc-19677 L, Santacruz) ou son isotype (sc-3879, Santacruz). Pour certaines expériences, les cellules étaient stimulées par la voie du TLR-9 grâce à l'ajout d'1 µM d'ODN CpG 2006 (ODN 7909, cat# tlr-2006, Invivogen), ou par la voie du BCR grâce à l'ajout de 20µg/mL d'anticorps de chèvre anti-IgA+IgG+IgM (H+L) humaines (no : 109-005-064, Jackson Immunoresearch).

Pour les cultures en condition d'allostimulation, les PBMC congelées de pemphigus et de donneurs sains étaient réchauffés rapidement, lavées avec une solution de milieu RPMI1640 supplémenté avec 50% de SVF, puis étaient resuspendues dans du milieu RPMI1640 supplémenté et laissées à reprendre pendant 24 heures en étuve à 37°C avec 5% de CO₂. Le lendemain, les PBMC décongelées étaient lavées et resuspendues dans 2 mL de milieu de culture RPMI1640 supplémenté à 1.10⁶/mL en plaque de 12 puits en présence de PBMC de donneurs sains, supposément allo-incompatibles, préalablement irradiées. Ces PBMC de donneurs sains à irradier provenait de l'EFS de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP, Paris, France) et avaient été préalablement congelées en SVF 90% et DMSO 10%. Ces PBMC de donneurs sains étaient décongelées le jour de la mise en culture des PBMC de pemphigus, irradiées en solution par la délivrance de 30 Grays au moyen d'un irradiateur (XRAD 320®), puis lavées avant d'être utilisées en culture. Les PBMC de pemphigus étaient alors cultivés avec les PBMC de donneurs sains irradiées (ratio 1 :1). A J0, les cultures étaient traitées par Nil ou 1µg/mL d'anticorps polyclonal de lapin anti-CD83 humain ou de gammaglobulines de lapin.

En fonction des expériences, les PBMC étaient prélevées à J1, J4, et/ou J6 pour l'étude de l'expression de CD83m et des marqueurs d'activation exprimés par les LB. Les surnageants de cultures étaient prélevés, selon les expériences à J1, J6 et J10 afin de réaliser les dosages par ELISA.

Cytométrie de Flux

Les PBMC de patients ayant un pemphigus actif ou de donneurs sains (250 000 cellules) prélevées à J0 et lors des cultures (1 10⁶ cellules) étaient marquées à 4°C en PBS contenant 5% de SVF inactivé, 0.02 M d'azide de sodium et 100µg/mL d'immunoglobulines humaines (Merck Millipore) et incubées

pendant 25 minutes avec les anticorps ou les contrôles isotypiques correspondants en quantités adaptées au nombre de cellules à marquer. Le marquage des marqueurs de surface par cytométrie de flux a utilisé les anticorps suivants : FITC anti-CD3 (ref :A07746, Beckman Coulter), APC-AF750 anti-CD45 (ref :A79392, Beckman Coulter), APC anti-CD19 (ref : IM2470, Beckman Coulter), PE-Cy7 anti-CD27 (ref : B4905, Beckman Coulter), PE-Cy5 anti-CD83 (ref : IM3240, clone HB15a, Beckman Coulter), PE anti-CD69 (ref : IM1943U, Beckman Coulter), BV421 anti-CD86 (ref : 562432, Becton Dickinson).

Les données de FACS ont été acquises sur BD FACS CANTO II (Becton Dickinson) hormis les données de cytométrie des expériences d'allostimulation qui ont été acquise sur un CytoFlex (Beckman Coulter). Les données ont été analysés avec FlowJo 10.0.8 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Pour chaque marquage, un minimum de 15,000 LB était analysé, hormis pour les prélèvements de patients prélevées après traitement par RTX (T1) du fait de l'absence de reconstitution complète du pool de LB circulants suite à la réalisation de prélèvements 6 à 12 mois après l'injection de RTX.

ELISAs

- **ELISAs - surnageants de culture**

Les taux d'IgG et d'IgM totales des surnageants étaient dosés avec des kits produits par Invitrogen (cat # : 88-50550 et 88-50620) selon les protocoles du manufacturier. Les taux de CD83s des surnageants étaient dosés avec le human CD83 duoset kit produit par R&D Systems (ref: DY2044-05) selon les instructions du manufacturier. Les échantillons et les standards étaient déposés en duplicats; les plaques étaient lues à 450 nm sur un lecteur Tristar2 (Berthold Technologies). L'analyse quantitative des résultats a été faite à l'aide d'une courbe logistiqua à 4 paramètres (4PL, MyAssays.com).

Pour le dosage des anticorps anti-Dsg1 et anti-Dsg3 dans les surnageants de culture, nous avons utilisé des kits ELISA commerciaux produits par MBL (MESACUP-1 et MESACUP-2 TEST) et EUROIMMUN (refs : EA 1495-4801 G and 1496-4801 G). Le protocole du manufacturier pour les ELISA Dsg1 et Dsg3 a été mis au point dans un but diagnostic. Considérant la faible abondance des LB autoréactifs circulants et donc par puit des plaques 12 puits, le taux d'anticorps anti-Dsg est habituellement non dosable dans les surnageants de culture. Afin d'obtenir un signal, nous avons concentré les surnageants avant de déposer les surnageants concentrés dans les puits des plaques MESACUP. Les surnageants de plusieurs puits de la même condition ont été poolés et concentrés à 10x grâce à des dispositifs d'ultrafiltration (AMICON Ultra 4 10K, Merck) ; 2 mL de surnageant étaient déposés dans la chambre d'ultrafiltration et les tubes étaient centrifugés à 4000 x g pendant 20 minutes afin de recueillir 200 µL de surnageant concentré. Les contrôles positifs et négatifs étaient déposés en duplicats et les échantillons concentrés étaient déposés en simplicat.

- **ELISAs – sérums des patients et des individus sains**

Les dosages quantitatifs des anticorps anti-Dsg 1 et Dsg3 des sérums de pemphigus ont été réalisés avec les kits de MBL selon les recommandations du fabricant.

Les concentrations de CD83s des sérums de pemphigus et de donneurs sains ont été réalisés avec un kit ELISA de haute sensibilité produit par Aviscera Biosciences (SK00495-01), selon les recommandations du fabricant. Les patients présentant des comorbidités pouvant influencer sur le dosage de CD83s (hémopathies B, autre maladie auto-immune) ont été exclus des analyses. Le taux de CD83s sérique a été comparés entre les patients ayant un pemphigus et des individus sains appariés par âge. Le taux de CD83s des patients a été quantifié à la période active de la maladie avant traitement et au moment de la rémission complète. Pour les patients traités par RTX, le taux de CD83s a aussi été quantifié 2 à 3 mois après les 2 injections, espacées de 2 semaines, de 1 g de RTX afin d'évaluer l'évolution du taux de CD83s lors d'une période de déplétion complète des LB circulants.

Analyses histologiques et immunohistochimiques sur prélèvement tissulaire.

Les biopsies cutanées et muqueuses des patients ayant un pemphigus avaient été fixées dans du formaldéhyde 4% et incluses en blocs de paraffine. Les analyses histologiques ont été réalisées sur des coupes de 4 µm colorés en HES (hématoxyline, éosine, safran).

Une coupe histologique par biopsie était analysée pour la quantification des grades des infiltrats lymphoïdes à un grossissement de 200 sur un microscope optique inversé (Zeiss Axio Observer). Les caractéristiques histologiques suivantes des infiltrats étaient recueillies : aspect (épars, nodulaire, ou diffus), renforcement (périvasculaire ou annexiel), Les infiltrats lymphoïdes étaient gradés selon une méthode déjà utilisée dans la littérature par Humby *et al* en 2009 et Zhou *et al* en 2020 (282,288). Les grades étaient définis en fonction du nombre de cellules présentes sur le rayon de la zone infiltrée (grade 1 : 2–5 cellules ; grade 2 : 6–10 cellules ; grade 3 : > 10 cellules). Chaque coupe histologique a été scannée à l'aide du logiciel Cartograph® (Microvision) ; la surface sous-épithéliale infiltrée sur chaque biopsie lésionnelle a été quantifiée au moyen du logiciel Histolab® (Microvision). Pour chaque coupe, la largeur du derme et la surface du derme ont été mesurées par le logiciel au moyen de forme géométriques tracées manuellement sur chaque coupe scannée ; la surface infiltrée a été mesurée par le logiciel après délimitation manuelle des zones infiltrées puis par reconnaissance automatique des zones ayant une coloration de noyau en HES. La densité de l'infiltrat a été évaluée à l'aide d'un indice afin de prendre en compte la variabilité de taille des biopsies analysées ; cet indice de densité consistait en la surface infiltrée rapportée à la largeur du derme mesuré sur la coupe histologique.

Les analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur des sections consécutives de 4 µm d'épaisseur. Les blocs de paraffine 12 patients ont été recoupé pour obtenir des sections de 4µm d'épaisseur qui ont été marquée en immunohistochimie à l'aide d'un automate Ventana BenchMark XT automated stainer (Ventana, Tucson, Arizona, USA). Après déparaffinage dans des bains successifs de xylène, réhydratation dans des bains d'éthanol de concentration décroissante, et démasquage antigénique dans un tampon citrate à pH10 par chauffage à 95° pendant 30 minutes, les lames étaient incubées avec l'un des anticorps primaires suivant : anti-CD3, anti-CD20, anti-CD138 (clone B-B4;

Diaclone, Stamford, CT; dilution 1:50), anti-CD21, anti-CD83 (cat. no. HPA041454, Sigma, dilution 1 :100). Les lames d'immunohistochimie ont été scannées avec le logiciel Cartograph® puis analysées avec le logiciel Histolab®. Pour chaque lame marquée, la largeur et la surface du derme ainsi que la surface colorée en immunohistochimie ont été mesurées.

Afin d'évaluer la proportion du tissu infiltré par les PBMC exprimant chacun des marqueurs et d'évaluer la proportionnalité de chacun de marqueur au sein de l'infiltrat, le rapport de la surface marquée par immunohistochimie a été rapporté à la surface infiltrée.

Co-immunofluorescence sur prélèvement tissulaire

Nous avons étudié en immunofluorescence, la colocalisation de CD83 et de CD19 sur des tissus lésés de pemphigus fixés et inclus en paraffine, Des coupes de 4 µm d'épaisseur étaient coupés et déposés sur des lames superfrost. Ces coupes étaient déparaffinées dans des solutions de xylène et réhydratées dans des solution d'éthanol de concentrations décroissantes. Pour exposer les antigènes, les sections étaient chauffées à 95°c dans une cocotte-minute dans un tampon citrate (10 mM, pH6) suivi d'une période de refroidissement de 20 minutes. Les sections étaient lavées à trois reprises dans une eau déionisée puis placées pendant 5 minutes en PBS. Les sections étaient bloquées avec un solution de PBS contenant 10% de sérum de chèvre (ref :31873, Thermofisher) et 0.5% de BSA (ref :A9418, Sigma) pendant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires et leurs isotypes contrôles ont été incubés sur la nuit à 4°c : Ac de lapin anti-CD83 humain (cat.No. HPA041454,SIGMA-ALDRICH), souris anti-CD19 humain (CF506236, Origene) tous deux dilués à 1:50 dans du PBS avec 0.5% BSA, gammaglobulines de lapin (ref: 011-000-002, Jackson ImmunoResearch) et l'isotype contrôle de souris IgG1 (Cat# MA1-10406, Invitrogen). Le lendemain, les sections étaient lavées puis incubées pendant 45 minutes à température ambiante, dans le noir avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS avec 0.5% de BSA : IgG de singe anti-lapin couplé à l'Alexa 647 (cat.No. 711-606-152, Jackson ImmunoResearch) dilué à 1:200 et IgG de singe anti-souris couplé à l'Alexa 488 (Ref. A21202, ThermoFisher Scientific) dilué à 1:500. Après lavage, les coupes étaient couvertes par une lamelle après avoir appliqué du Prolong glass® antifade mountant (Cat#: P36983, Invitrogen). Les sections étaient analysées le lendemain sur un microscope inversé à fluorescence (Zeiss Axio Observer) avec le logiciel Archimède®.

Analyses statistiques

En fonction de l'appariement des groupes, de la distribution des valeurs, les analyses statistiques comparant les différents groupes ont été réalisées avec des test paramétriques (test T apparié ou non apparié) ou des tests non paramétriques (test de Mann-Whitney, test des rangs signés de Wilcoxon). La normalité des données était évaluée par un test de Shapiro-Wilk. Les analyses ont été réalisés sur le logiciel Prism v9.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Les corrélations entre les valeurs de

CD83s et les paramètres cliniques et immunologiques du pemphigus ont été faites par analyse de corrélation de Spearman ou de Pearson en fonction de la normalité des données. Pour tous les tests, les différences étaient considérées comme significatives pour des valeurs de $P < 0.05$. Les résultats sont montrés en tant que moyennes \pm SEM (erreur standard de la moyenne) ou en tant que médianes \pm IQR (interquartile range) en fonction de la normalité de la distribution des données.

RESULTATS

Identification de différentes sous-populations de lymphocytes B par spectrométrie de masse chez les patients ayant un pemphigus actif ou en rémission et chez les donneurs sains.

Afin d'explorer la diversité phénotypique des lymphocytes B entre patients et donneurs sains, nous avons utilisé la spectrométrie de masse pour séparer différentes sous-populations de lymphocytes B grâce à l'analyse de l'expression différentielle de 40 marqueurs protéiques (**Fig. 23A**). L'utilisation de l'algorithme t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) permet de visualiser les LB en fonction de leur similarité d'expression sur un graphique en 2 dimensions (**Fig. 23B gauche**). L'analyse par RPhenograph permet de séparer cette cartographie en sous-populations phénotypiques cohérentes séparant les plus proches voisins (**Fig. 23B droite**). Ces sous-populations peuvent être visualisées sur un plot bidimensionnel en t-SNE (**Fig. 23B**) et l'expression médiane des différents marqueurs de chaque sous-population peut être visualisée sur une heat map (**Fig. 23C**).

En utilisant cette méthode, nous avons mis en évidence que les LB des donneurs sains et des patients pouvaient être séparés en 18 clusters bien définis (**Fig. 23B**). La proportion des différents clusters de LB diffère entre patients actifs et ceux à distance du traitement et entre patients et les donneurs sains (**Fig. 23B et 23D**). Notamment, les clusters les plus importants en proportion étaient les clusters 2 et 17 chez les donneurs sains, les clusters 14, 16 et 18 chez les pemphigus actifs, et les clusters 3, 11 et 17 chez les pemphigus en rémission (**Fig. 23D**).

Ces résultats mettent en évidence une disparité phénotypique des LB entre patients actifs et les donneurs sains. Ainsi, on constate la surexpression des IgA et des IgG de surface dans des clusters surreprésentés chez certains patients actifs (clusters 8, 15 et 18, **fig. 23D**). Cependant, les clusters les plus prépondérants (clusters 14 et 16) chez les patients actifs, et absents chez les donneurs sains, présentent une expression modérée des IgA, des IgG et des IgM de surface suggérant que l'auto-réactivité des LB des patients repose sur plusieurs sous-populations hétérogènes de LB. Les LB des clusters 14 et 16 présentent une expression faible de CD27, mais aussi plus faible de CD21 en comparaison aux clusters présents chez les donneurs sains.

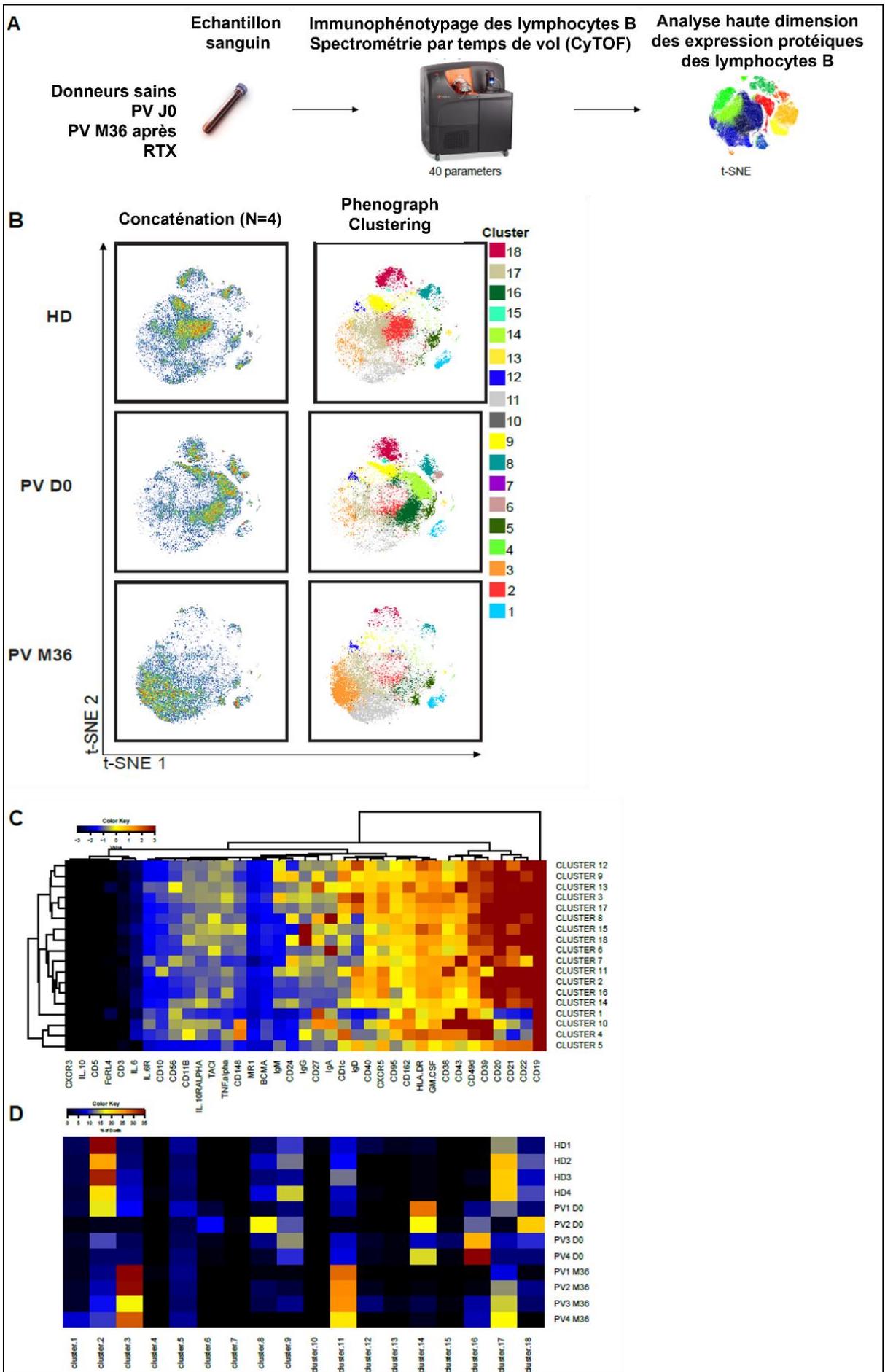


Figure 23. Résultats de l'analyse de l'expression d'un panel de 37 marqueurs par les lymphocytes B de patients ayant un pemphigus actif (J0), en rémission (M36) et de donneurs sains (HD) en spectrométrie de masse. A. Représentation schématique des étapes de l'analyse par CYTOF. B. Représentation t-SNE des différents clusters de lymphocytes B CD19+ basée sur l'analyse de l'expression de 40 marqueurs. C. Différence d'expression des marqueurs analysés sous forme de Heatmap au sein des différents clusters de lymphocytes B CD19+. D. Proportion des différents clusters de lymphocytes B des donneurs sains, des patients ayant un pemphigus actif ou en rémission.

D'autre part, l'analyse des marqueurs surexprimés dans ces clusters met en évidence une différence de maturation des LB entre patients actifs et patients après traitement. Les clusters prépondérants chez les patients en rémission (clusters 3,11 et 17) présentent une expression des IgD plus importante que les autres clusters, associé à une surexpression d'IgM et de CD38 et pour partie de CD24, ainsi qu'une expression faible de CD27, suggérant que des LB immatures, matures naïfs ou transitionnels sont majoritairement retrouvés chez les patients en rémission 3 ans après traitement RTX. Ces résultats sont en accord avec des données antérieures montrant l'apparition de LB transitionnels, ayant une production d'IL-10 caractéristique de Bregs, après reconstitution du pool de LB après traitement par rituximab. CXCR5, le récepteur de CXCL13 qui est nécessaire à la recirculation et au retour des LB vers les organes lymphoïdes secondaires est surexprimé dans les clusters prépondérant chez les patients en rémission mais l'est aussi dans les clusters des patients actifs. Le CD39, une ectonucléotidase ayant une action immuno-régulatrice par son hydrolyse de l'ATP extracellulaire (455), qui est habituellement présentes sur les LB matures semble moins surexprimées dans les clusters prédominants chez les patients en rémissions que dans les autres clusters.

Ainsi, les sous-populations de LB diffèrent entre patients actifs et donneurs sains et entre les patients au stade actif du pemphigus et au stade de rémission. Bien que les LB de patients en rémission à M36 partagent avec ceux des donneurs sains une prédominance du cluster 11, ils diffèrent cependant pour les autres clusters. Cela montre que, bien qu'induisant la rémission et modifiant le phénotype des LB, le traitement par RTX ne restaure pas, chez les patients ayant un pemphigus, des populations lymphocytaires B phénotypiquement identiques aux donneurs sains. Ces différences phénotypiques pouvant ainsi participer au risque de rechute à distance du traitement.

Différences transcriptomiques entre lymphocytes B de patients ayant un pemphigus et de donneurs sains.

Afin, d'appréhender plus en profondeur les différences phénotypiques des LB de patients et de donneurs sains, nous avons réalisé en coopération avec le SiGN (Singapore) une analyse par séquençage de l'ARN (RNA-seq) des LB des mêmes patients et donneurs sains que ceux étudiés par CYTOF. Le

RNAseq permet d'analyser l'abondance des ARN transcrits de l'ensemble du transcriptome de cellules à un moment donné. Ainsi, le nombre de gènes dont les transcrits sont étudiés est plus important que le nombre de gènes dont les protéines traduites sont analysées en CYTOF bien que le nombre de cellules étudiées soit moins important en RNA-seq qu'en CYTOF.

L'analyse des composantes principales (PCA) de l'expression génique de LB de patients et de donneurs sains montre que les profils d'expressions géniques diffèrent entre les patients et les donneurs sains (**Fig. 24A**). Alors que plusieurs sous-populations phénotypiquement différentes avaient été mises en évidence par CYTOF, notamment en lien avec la présence d'Ig de surface, la PCA représentée en figure 24A a considéré le transcriptome de LB de certains clusters de LB de patients, définis par leur l'expression différentielle de certains gènes (IgG et IgA), en comparaison à des LB de donneurs sains appariés phénotypiquement. Cette approche permet de s'intéresser plus précisément aux sous-populations de LB d'intérêt plutôt qu'à l'ensemble des LB afin de montrer précisément les différences d'expression génique de ces clusters par rapport à des clusters de LB de donneurs sains appariés en fonction de leur expression d'IgG, d'IgA ou l'absence d'expression d'IgG et d'IgA (LB double négatifs, DN). La PCA met ainsi clairement en évidence que l'expression du transcriptome des patients actifs entre eux et des donneurs sains entre eux est proche alors que les transcriptomes des patients actifs et des donneurs sains sont différents lorsqu'on analyse ces sous-populations de LB (**Fig. 24A**).

L'analyse des gènes différentiellement exprimés (DEGs) entre les LB totaux de patients et de donneurs sains mettait en évidence que 1412 gènes, dont 996 ayant une fonction connue, étaient significativement plus transcrits chez les patients (**Fig. 24E**). En analyse fonctionnelle, 146 de ces gènes étaient enrichis chez les patients en comparaison aux donneurs sains (**Fig. 24C**). En analysant les DEGs des clusters de LB phénotypiquement appariés en fonction de leur expression d'IgG, d'IgA ou double négatifs (**Supp. Data 1**), 38 gènes présentaient une transcription significativement augmentée dans les 3 clusters en comparaison au transcriptome des donneurs sains (**Fig. 24B et 24C**). Parmi ces 38 gènes, 4 gènes codent une protéine associée à la surface cellulaire, suggérant un potentiel de cible thérapeutique visant à dépléter les LB ou à en moduler l'activité les patients ayant un pemphigus. Ces 4 gènes sont CD83, SNX9, CYLD, PTP4A1. Parmi ces gènes, CD83 semble la cible présentant le plus grand intérêt. En effet, CD83 est une protéine exprimée à la membrane d'un large panel de cellules immunitaires, dont le clivage membranaire libère une forme soluble ; ces 2 formes étant impliquées dans la régulation de l'immunité. Les 3 autres gènes (CYLD, PTP4A1, SNX9) codent pour leur part pour des protéines intracellulaires impliquées notamment dans la régulation processus tumoraux et leur expression par les LB est moins explorée dans la littérature que pour CD83.

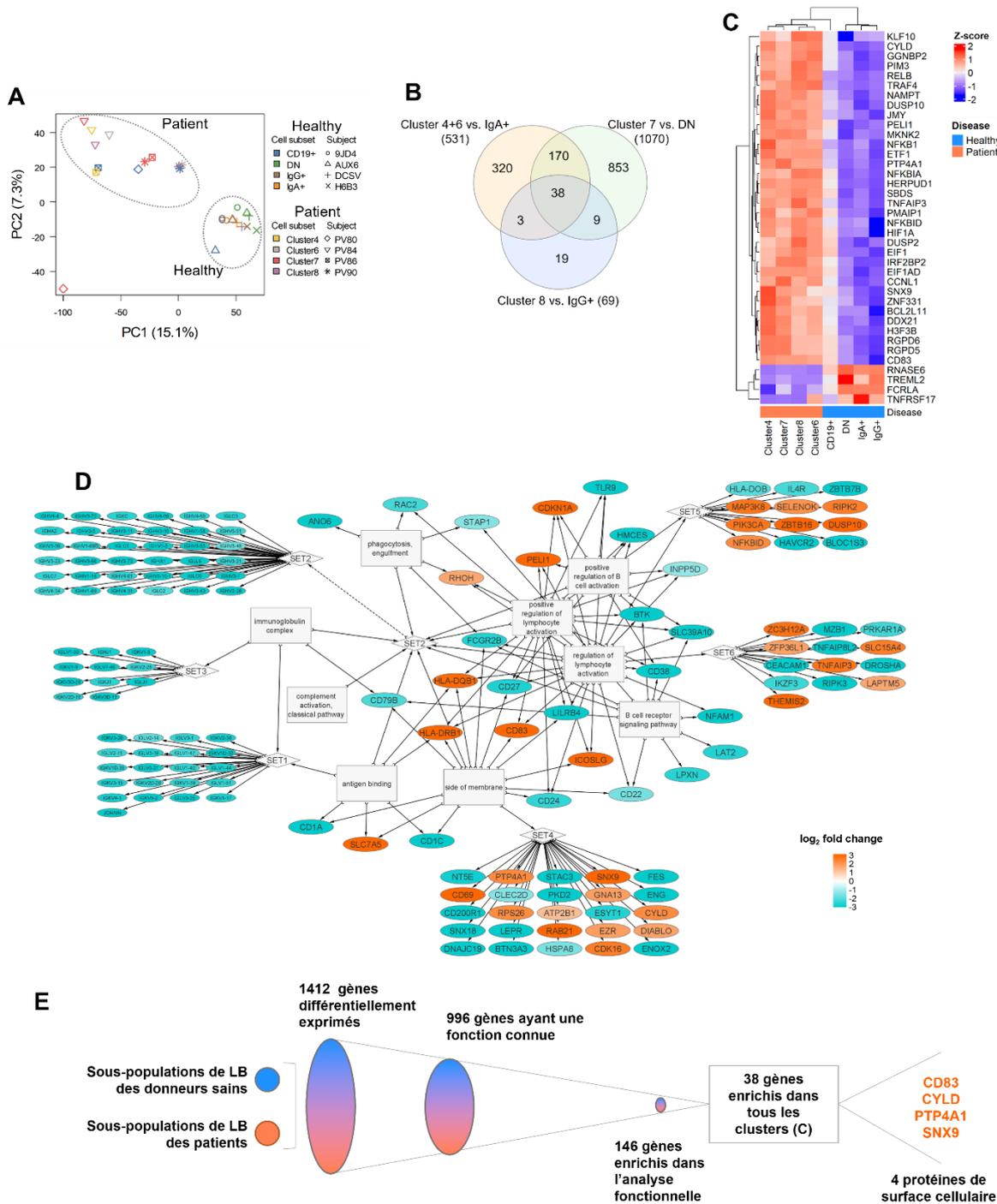


Figure 24. Résultats de l'analyse par RNA-seq des lymphocytes B de patients ayant un pemphigus et de donneurs sains.

(A) Analyse en composantes principales des profils d'expression génique des sous-populations de LB (clusters 4, 6, 7, 8) extraites de patients (n=4) et de sous-populations de LB appariées phénotypiquement (IgA+, IgG+, Double négative IgA-IgG-) extraites de donneurs sains. (B) DEGs des différentes sous-populations de LB de donneurs sains et de patients ayant un pemphigus. (C) Heatmap des niveaux d'expression des 38 gènes DEGs entre les différents sous-populations de LB. (D) Analyse de l'ontologie génique sous forme de réseau des DEGs. Les composantes de l'ontologie génique (Noeux rectangulaires) enrichies dans la liste des DEGs sont connectées par des flèches aux gènes différentiellement exprimés (Noeux elliptiques comportant le nom du gène). Pour faciliter la lecture, les gènes appartenant à la même composante d'ontologie génique sont regroupés en ensembles (noeux en losange) et les ensembles de gènes sont reliés aux termes d'ontologie génétique. (E) Illustration du processus d'identification des protéines de surface cellulaire fonctionnellement importantes pouvant représenter des cibles thérapeutiques.

Différences transcriptomiques des LB Dsg3+ et Dsg3- des patients ayant un pemphigus actif, et en rémission et de donneurs sains.

Les auto-anticorps produits par les LB autoréactifs du pemphigus, dont la pathogénicité est la mieux établie, sont les anticorps anti-Dsg3 et les anticorps anti-Dsg1. Afin d'analyser plus précisément les différences transcriptomiques impliqués dans cette production d'auto-anticorps par les LB autoréactifs, de pemphigus, nous avons étudié par sc-RNA-seq les différences d'expression génique du transcriptome de LB CD19+ Dsg3+ et de LB CD19+Dsg3- chez des patients ayant un pemphigus au stade actif, des patients en rémission à M36 du traitement par RTX et de donneurs sains (**Fig. 25A**). L'analyse a porté sur 7 à 22 LB Dsg3+ ou Dsg3- (**Fig. 25A**). La visualisation par UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) confirme une ségrégation des transcriptomes en fonction du statut malade/donneur et en fonction du statut actif/rémission du pemphigus (**Fig. 25B**). L'analyse UMAP des transcriptomes des LB Dsg3+ et Dsg3- des patients et donneurs sains ne met pas en évidence de regroupement des transcriptomes des LB en fonction de leur statut Dsg3+ et Dsg3- montrant que d'autres facteurs interviennent dans les ségrégation des transcriptomes des patients et des donneurs sains. L'analyse du transcriptome des LB Dsg3+ et Dsg3- des patients et donneurs sains met en évidence de nombreux gènes différentiellement exprimés (**Fig. 25C-D, Supp Data 2 A-D**). Parmi les gènes des LB Dsg3+ montrant une transcription augmentée chez les patients actifs en comparaison aux LB Dsg3+ des donneurs sains figure CD83 (**Fig. 25D**). Cette transcription augmentée du gène de CD83 par les LB Dsg3+ des patients en comparaison aux donneurs sains persiste à M36 (**Fig. 25E**), alors qu'une augmentation de la transcription de CD83 n'a pas été mise en évidence lors de la comparaison des LB Dsg3+ de patients à J0 et M36 (**Supp Data 2 A**). On constate par ailleurs que de nombreux gènes sont toujours différentiellement exprimés par les LB Dsg3+ et Dsg3- des patients en rémission en comparaison aux LB des donneurs sains (**Fig. 25E et Supp Data 2C**), montrant que le transcriptome des patients mis en rémission par le RTX persiste à différer de celui des individus sains.

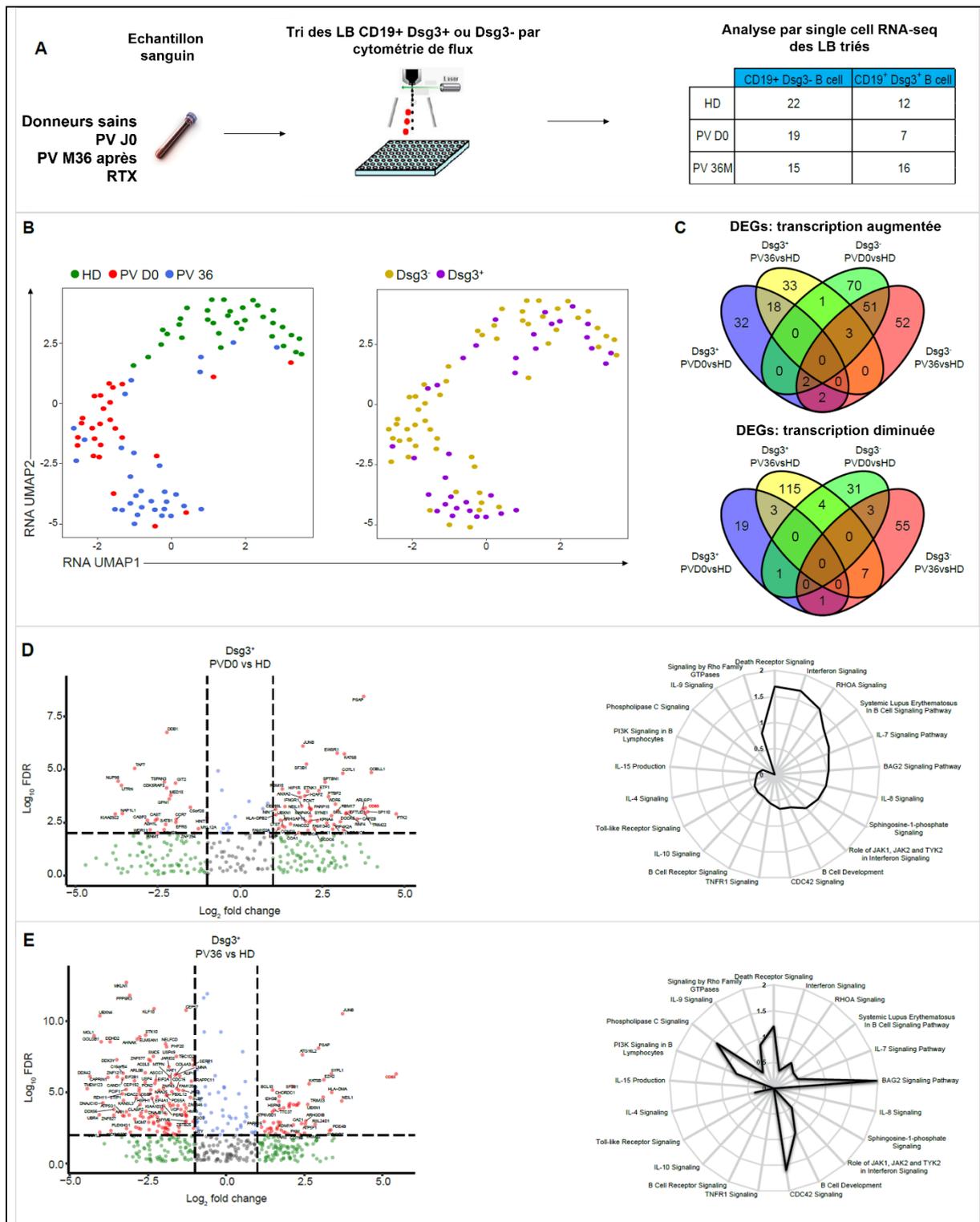


Figure 25. Résultats de l'analyse par single cell RNA-seq des lymphocytes B CD19+ Dsg3+ de patients et de donneurs sains.

(A) Représentation schématique et nombre de cellules de chaque condition analysées en single-cell RNA-seq après tri des LB CD19+Dsg3+ et Dsg3- des patients et donneurs sains. (B) Analyse des regroupement (clustering) d'expression transcriptomique par UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) en fonction du statut clinique (gauche) et en fonction de l'expression de Dsg3 par les lymphocytes B (droite). (C) Gènes différemment exprimés (DEGs) par les lymphocytes B Dsg3+ et Dsg3- de patients actifs (PVD0) ou en rémission (PVM36) et par les lymphocytes B Dsg3+ et Dsg3- de donneurs sains (HD) ; Gènes transcrits de façon plus importantes chez les patients (haut) et gènes transcrits de façon moins importante chez les patients (bas). (D) DEGs par les lymphocytes B Dsg3+ de patients actifs et de donneurs

sains (gauche) et représentation de l'analyse des voies de signalisation enrichies chez les patients. (E) DEGs par les lymphocytes B Dsg3+ de patients en rémission et de donneurs sains (gauche) et représentation de l'analyse des voies de signalisation enrichies chez les patients.

CD83 ne fait en revanche pas partie des gènes différentiellement exprimés par LB Dsg3- des patients et des donneurs sains, renforçant l'intérêt de la différence de transcription mise en évidence entre les LB Dsg3+ des patients et des donneurs sains. Ainsi, CD83 pourrait avoir un rôle important dans le processus d'auto-réactivité médié par les LB Dsg3+ producteurs d'anticorps anti-Dsg3+ et pourrait constituer un cible d'intérêt pour des thérapies futures visant à dépléter les LB autoréactifs, ou à en moduler l'activité, chez les patients actifs en vue d'apporter une rémission et les patients en rémission à distance du traitement pour consolider la guérison.

CD83m est surexprimé par les lymphocytes B de patients ayant un pemphigus actif en comparaison aux donneurs sains

Comme les données de RNA-seq sur les sous-population de LB de pemphigus et les données de scRNA-seq de LB Dsg3+ montraient une augmentation de la transcription de CD83 chez les patients ayant un pemphigus, nous avons étudiés l'expression de CD83m par les PBMC de patients ayant un pemphigus par FACS (Gating strategy- Supp Data 3).

Les lymphocytes B des patients ayant un pemphigus ne représentait que 10 à 24% des leucocytes chez les patients au stade actif T0 et leur taux était fortement réduit après traitement par RTX au temps T1 (**Fig. 26A**). Les cellules exprimant CD83m représente un faible pourcentage des leucocytes, le % de LB CD83+ comptant pour plus de la moitié des leucocytes CD45+ (**Fig. 26B**). Les pourcentage de LB exprimant CD83m est significativement plus important chez les patients ayant un pemphigus actif (médiane : 9.7%) que chez les donneurs sains qui l'expriment peu (médiane : 1.5%) (**Fig. 26C**). L'expression de CD83m par les LB diminue significativement après traitement sans pour autant retrouver les pourcentages d'expression des donneurs sains (**Fig. 26C**). Les LB exprimant CD83m semblent plus activés chez les patients actifs que chez les donneurs sains compte tenu d'une surexpression relative de CD69 et significativement plus importante de CD86, deux marqueurs d'activation des LB (**Fig. 26D-E**). Ces lymphocytes B CD83+ sont en très grande partie des LB naïfs CD27- dans le pemphigus (**Fig. 26F**). D'autre part, la comparaison des expression membranaire de CD69 et de CD86 par les LB CD83+ et ceux CD83-, montre que les LB CD83+ expriment de manière plus importante CD69 et de manière égale CD86 (**Fig. 26 G-H**). Ainsi, dans le pemphigus actif, il existe une proportion plus importante de LB circulants CD83+ au phénotype activé par rapport aux donneurs sains et ces LB CD83+ sont principalement des LB naïfs, qui expriment plus fortement le marqueur d'activation CD69 par rapport aux LB CD83-.

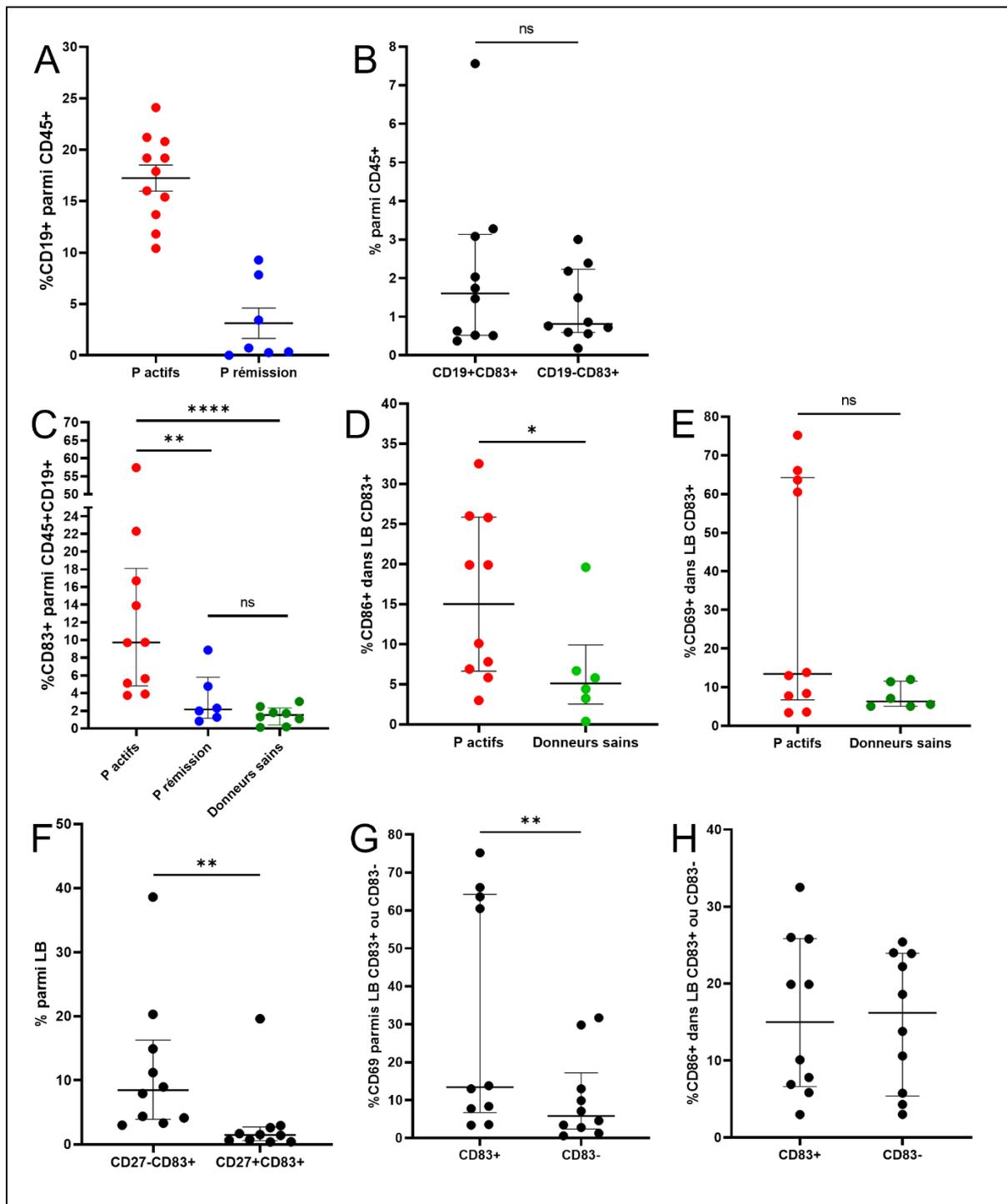


Figure 26. Etude par FACS de l'expression de CD83m par les LB de patients ayant un pemphigus actif ou en rémission et de donneurs sains.

A. Proportion de LB parmi les PBMC de patients ayant un pemphigus avant et après traitement par RTX ; B. Pourcentage de LB CD83+ et de cellules non lymphocytaire B CD83+ parmi les leucocytes ; C. Pourcentage de LB exprimant CD83m chez les patients et les donneurs sains ; D. % de LB CD83+ exprimant CD86 ; E. Pourcentage de LB CD83+ exprimant CD69 ; F. % de LB naïfs CD83- et mémoires CD83- ; G. % d'expression de CD69 parmi les LB en fonction de l'expression de CD83 ; H. Pourcentage d'expression de CD86 parmi les LB en fonction de l'expression de CD83. Les données sont exprimées en médianes +/- IQR (A-H). Test de Mann-Whitney (B-E), Test des rangs signés de Wilcoxon (F-H) ns : $P > 0.05$, * : $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$

En zone lésée de pemphigus vulgaire et superficiel, la derme et le chorion contiennent des structures ectopiques lymphocytaires comprenant des LB exprimant CD83m

Après avoir montré que le sang circulant de pemphigus comptait des LB exprimant CD83+ au sein des population de LB totaux, nous avons cherché à montrer que des LB infiltrant les tissus lésés exprimait CD83m.

Récemment, une équipe a montré dans 2 travaux la présence de structures ectopiques lymphocytaires au sein des tissus lésés de pemphigus (282,297). Jusqu'à présent, la plupart des dermato-pathologistes considéraient que les infiltrats du derme étaient majoritairement peu abondants, et d'aspect réactionnels avec une prédominance de LT dans la peau alors que ceux des muqueuses étaient plus diffus avec des infiltrats polymorphes contenant notamment des plasmocytes. Ces travaux soulignaient la présence de LB au sein de ces structures, notamment de LB autoréactifs anti-Dsg3+, qui seraient proportionnellement présents en plus grand nombre dans la peau que dans le sang circulant. Du fait de ces données récentes, nous avons d'abord entrepris de confirmer la présence de structures ectopiques lymphocytaires en tissus lésés de pemphigus et de caractériser leur abondance ainsi que leur composition.

Soixante-quinze biopsies réalisées en peau lésée correspondant à 63 patients, dont 53 avec un PV et 10 avec un PS (**Flow chart : supp Data 4 ; données cliniques des patients : supp data 5**), ont été analysées pour évaluer la densité d'infiltrat et les grades des infiltrats (**Fig. 27A**). La plupart des sections étudiées mettaient en évidence des infiltrats lymphocytaires aussi bien dans les PS que dans les PV, dans la peau et dans les muqueuses (**Supp data 6**), sous forme d'infiltrats, du derme superficiel ou moyen, épars sans architecture, nodulaires, ou d'infiltrats diffus et dense (**Supp data 6 et 7**). Les infiltrats dermiques présentaient dans 80% des cas un renforcement périvasculaire et dans 40% des cas en péri-annexiel (**Supp data 7**) ; ce renforcement était moins fréquemment rencontré dans le chorion des muqueuses du fait de la présence d'infiltrat souvent diffus. Des infiltrats de grade 1 étaient mis en évidence dans 98.7% des biopsies, alors que des infiltrats de grade 2 et 3 étaient mis en évidence dans 70.7% et 42.7% des biopsies, respectivement (**Fig. 27B**). De manière surprenante, il n'y avait pas plus d'infiltrats de grade 2 et 3 dans les muqueuses que dans la peau des biopsies de PV ; d'autre part une plus grande proportion de biopsies de PS présentait des infiltrats de grade 2 et une proportion identiques d'infiltrat de grade 3 en comparaison aux biopsies de PV (**Fig. 27 C-E**). Malgré ces différences de proportion de grade entre biopsies de PV et de PS, il n'y avait pas de différence significative de densité d'infiltrat entre les muqueuses de PV et le derme de PV et de PS (**Fig. 27F, Supp data 8A**).

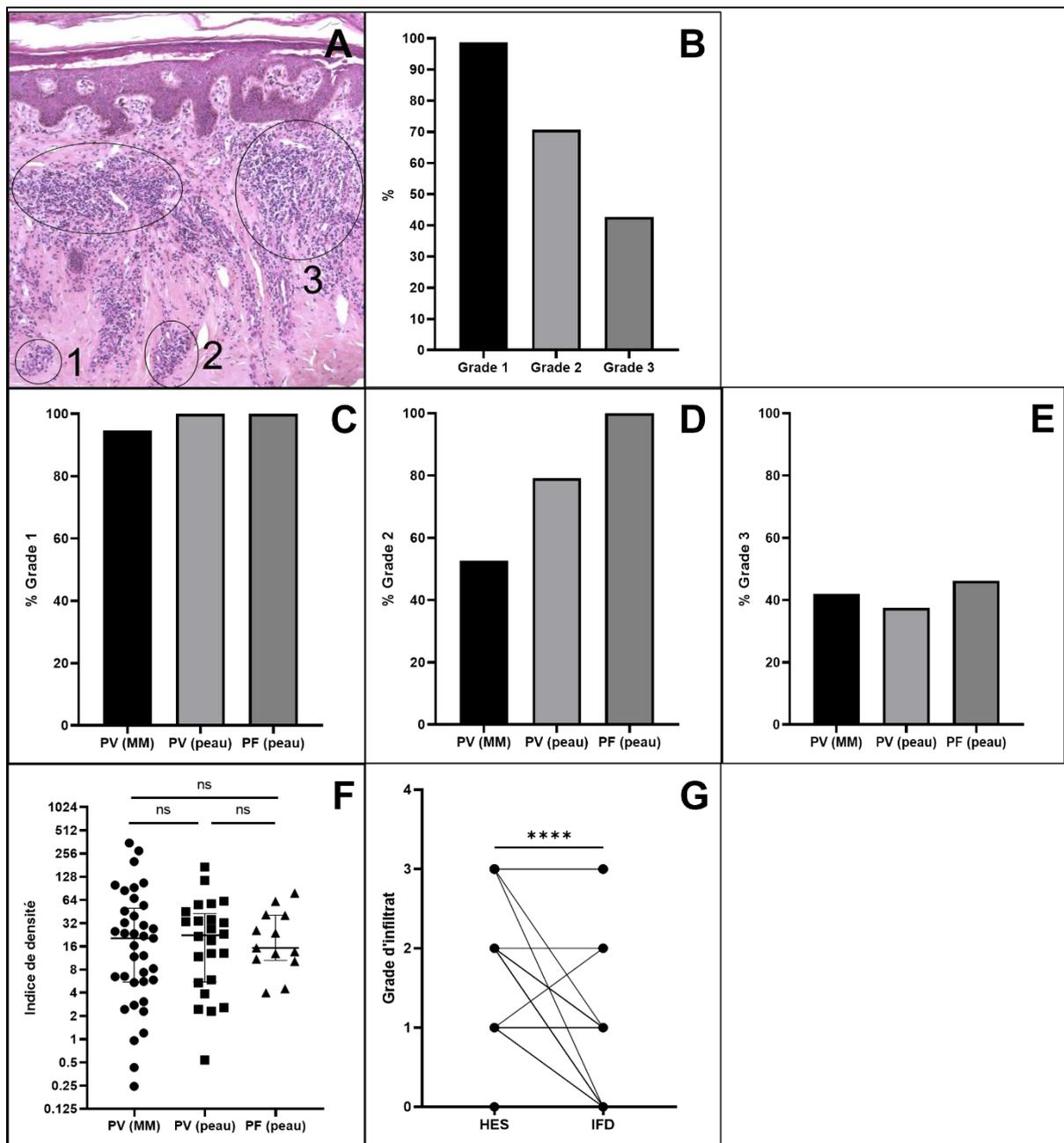


Figure 27. Analyses des infiltrats lymphocytaires de la cohorte de biopsies de pemphigus.

A. Exemple d'infiltrats lymphocytaires dermiques de grade 1, 2, et 3 sur une biopsie cutanée de PS (HES, x50) ; B. Pourcentage de biopsies présentant des infiltrats de grade 1, 2 et 3 respectivement ; C-E. Pourcentage de biopsies présentant des infiltrats de grade 1, 2 et 3 au sein des biopsies de muqueuse ou de peau de PV et de peau de PS. F. Comparaison des indices de densité d'infiltrat lymphocytaire sur les biopsies de muqueuse de PV et de peau de PV et de PS (médiane +/- IQR). G. Comparaison des grades d'infiltrats en zone lésée (zone biopsiée pour examen histologique avec coloration HES) et en zone péri-lésionnelle (zone biopsiée pour IFD) chez 30 patients. Test de Mann-Whitney (F) et Test T apparié (G). ns : $P > 0.05$, **** $P < 0.0001$.

En revanche, il existait une différence importante concernant les grades d'infiltrats observés entre les biopsies réalisées en peau lésionnelle pour l'examen histologique et les biopsies appariées réalisées plus à distance pour l'examen par IFD chez les 30 patients où cette comparaison a été possible du fait de la disponibilité de lames examinables pour les fragments biopsiques d'IFD (**Fig. 27G**). Ainsi, nos résultats

montrent la présence d'infiltrats lymphocytaires d'architectures variables, souvent organisés, au sein du derme et du chorion des zones lésées par les pemphigus vulgaires et superficiels dans des proportions proches ; ces infiltrats semblent plus importants en zone lésée que plus à distance des lésions de pemphigus.

Douze patients présentant des infiltrats de grade 3 ont été analysés en immunohistochimie afin de caractériser la composition cellulaire de ces infiltrats. Les marquages immunohistochimiques sur coupes sériées ont mis en évidence la présence de LT CD3+ (100%), de LB CD20+ (91.6%) et de plasmocytes CD138+ (91.6%) chez la plupart des patients (Fig. 28A). Seule une biopsie muqueuse présentant un infiltrat dense sous une zone muqueuse ulcérée a montré une composition différente avec très peu de LB et de plasmocytes et un tissu inflammatoire majoritairement constitué de LT, de polynucléaires neutrophiles et de macrophages. Au sein des infiltrats, la surface marquée par le CD3 occupait en moyenne 11.0% (range : 4.0%–18.1%) de la surface infiltrée alors que les marqueurs de LB, CD20 et CD138, occupaient respectivement 8.0% (range : 0.5%–14.2%) et 6.7% (range : 0.4%–18.3%) de la surface infiltrée (Fig. 28B). Ainsi, les LB et plasmocytes représentent une partie importante des cellules composant ces infiltrats. Le CD21 n'était exprimé au sein des infiltrats que sur de rares prélèvements (16.6%), par de très rares cellules éparses, montrant l'absence de cellules dendritiques folliculaires, et faisant ainsi caractériser ces infiltrats constitués de LT, de LB et de plasmocytes comme des structures ectopiques lymphocytaires plutôt que comme des structures lymphoïdes tertiaires (Fig. 28B). La surface marquée par le CD83 occupait en moyenne 3.3% (range : 0.8%–7.3%) de la surface infiltrée (Fig. 28B). Ainsi, la proportion de cellules des infiltrats exprimant CD83 semble moins importante que la proportion de LT, de LB ou de plasmocytes. Par ailleurs, il n'y avait pas de différence significative de répartition cellulaire entre les PV et les PS, et entre les biopsies cutanées et muqueuses (Supp. Data 9A). Alors que la disposition des marqueurs au sein des infiltrats et l'absence de co-marquage en immunohistochimie ne permettent pas de supposer quelles cellules expriment CD83, le % de surface marquée par CD83 était positivement corrélé au % de surface marquée par CD138 ($P : 0.0106$; $r : 0.7$; $R^2 : 0.5$) (Fig. 28C), alors que les surfaces des autres marqueurs ne montraient pas de corrélation avec celle de CD83 (Supp. data 9B).

Afin de montrer que les LB exprimaient CD83m, nous avons étudié en co-immunofluorescence la co-expression de CD83 et de CD19 sur des coupes de biopsies de peau lésée de 3 patients ayant un pemphigus actif, afin d'observer aussi bien les LB CD20+ que ceux CD20-, du fait de la présence de plasmocytes au sein des infiltrats et de la corrélation entre la surface marquée par CD83 et CD138. L'analyse par co-immunofluorescence mettait en évidence la colocalisation de cellules exprimant CD19 et CD83 confirmant la présence au sein des structures ectopiques lymphocytaires de LB exprimant CD83m (Fig. 29A et B).

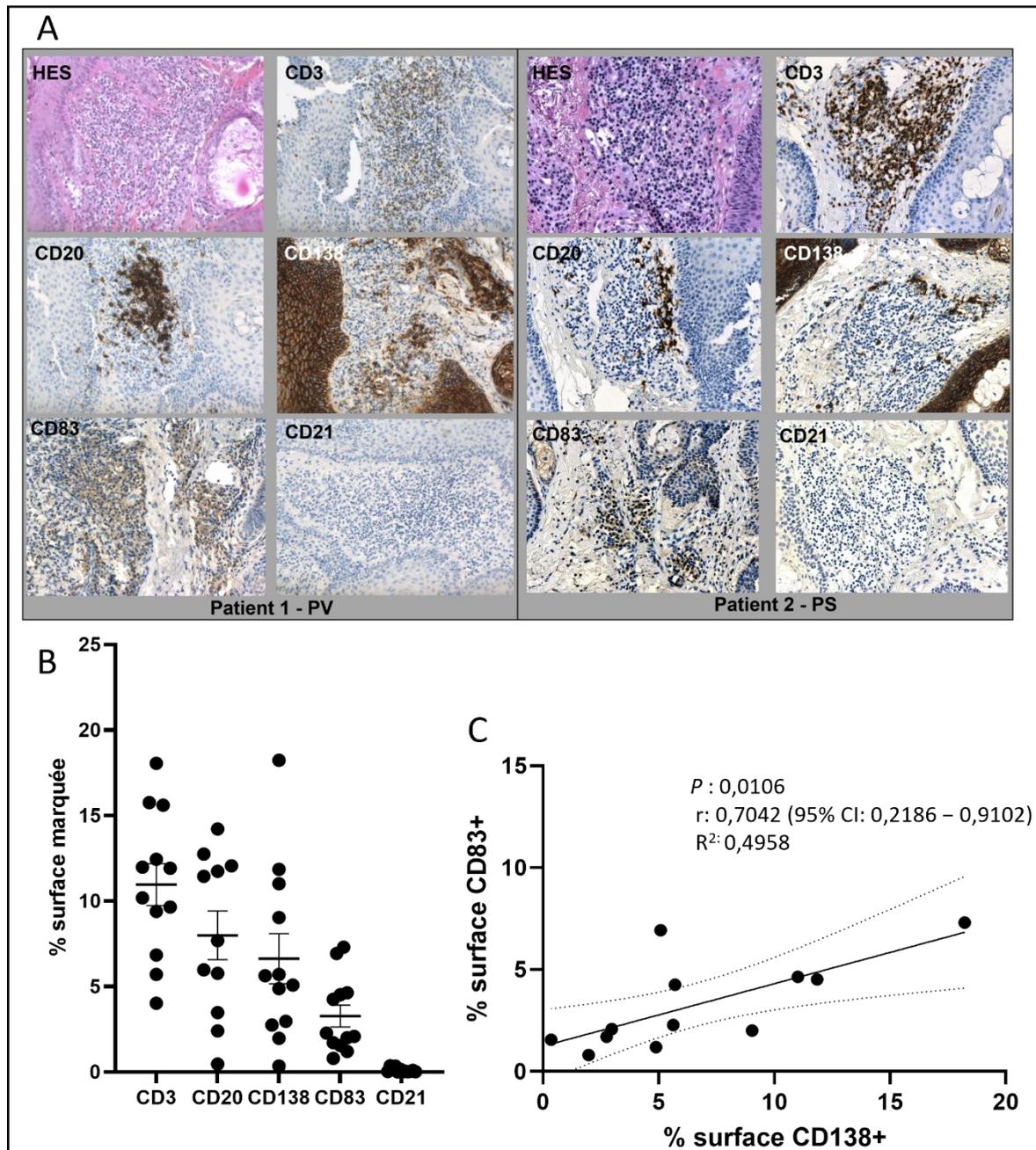


Figure 28. Composition des infiltrats lymphocytaires des zones lésées de pemphigus.

A. Images représentatives des analyses histologiques (HES) et immunohistochimiques (CD3, CD20, CD138, CD83, CD21) sur coupes sériées de 2 patients (patient 1 : PV ; patient 2 : PS) représentatives de 11 des 12 patients analysés. B. Proportion de surface marquée rapporté à la surface des infiltrats (moyenne +/- SEM). C. Analyse de corrélation par test de Pearson des surfaces marquées par CD83 et CD138 rapportées à la surface de l'infiltrat.

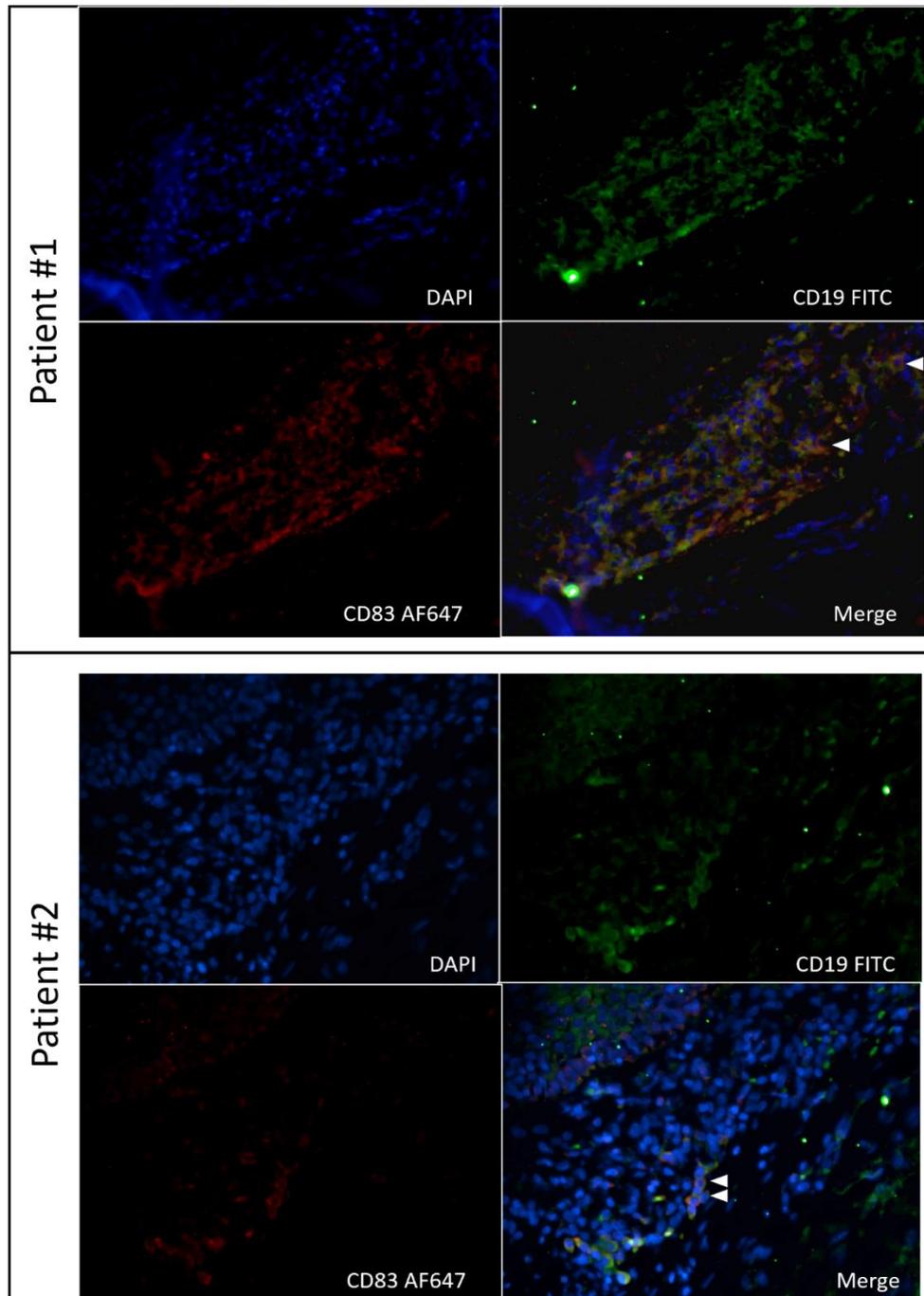


Figure 29. Co-immunofluorescence de CD19 et de CD83 au sein du derme en peau lésée de pemphigus. Résultats du co-marquage de 2 patients : coloration du noyau par Nuclblue (bleu, haut à gauche), des LB CD19+ par FITC (vert, haut à droite), des cellules CD83+ par AF647 (rouge, bas à gauche), merge (bas à droite). Têtes de flèches : cellules CD19+CD83+.

Le CD83 soluble sérique est abaissé chez les patients ayant un pemphigus actif et est corrélé positivement aux taux d'anticorps anti-Dsg3

Compte tenu de la surexpression du CD83m par les LB circulant et de l'expression de CD83m par les LB infiltrant les tissus lésés dans le pemphigus, nous nous sommes intéressés à rechercher une éventuelle modification du taux de CD83s sérique chez les patients ayant un pemphigus ; les LB étant, avec les cellules dendritiques, une des principaux types cellulaires responsable de la production de CD83s.

Nos résultats de dosage du CD83s par un ELISA commercial mettent en évidence un taux de CD83s plus faible chez les patients ayant un pemphigus actif en comparaison avec les donneurs sains (**Fig. 30A**). Le taux de CD83s était plus bas ($P < 0.0001$) chez les patients prélevés lors du diagnostic initial que lors d'une rechute (**Fig. 30B**) et les patients ayant un infiltrat de grade 3 sur la biopsie présentait un taux de CD83s significativement plus bas que ceux avec un infiltrat de grade 2 ou de grade 1 (**Fig. 30C**). Le taux de CD83s était significativement plus élevé chez les patients après rémission clinique suite au traitement que lors de la phase d'activité du pemphigus ($P < 0.0001$), sans pour autant atteindre le taux moyen des donneurs sains ($P < 0.0001$) (**Fig. 30D**) suggérant une implication du CD83s dans la physiopathogénie du pemphigus. Cette différence du taux de CD83s était retrouvée avec les différents types de traitements (**Supp Data 5**), aussi bien chez les patients ayant été traités par RTX ($P : 0.0048$, moyenne des différence 1106 pg/mL, IC95 [397 – 1815]) que chez ceux ayant reçu dans immunosuppresseurs conventionnels ($P : 0.0094$, moyenne des différence 1085 pg/mL, IC95 [325 – 1846]) (**Fig. 30 E-F**). Chez les patients ayant eu des prélèvements de sérums 2 à 3 mois après le cycle de RTX, soit lorsque la déplétion périphérique des LB est la plus profonde, le taux moyen de CD83s sérique était comparable au taux avant traitement, montrant que la déplétion B n'est pas responsable d'une diminution du CD83s à ce terme (**Fig. 30 G**). Enfin, alors que le taux de CD83s différaient en fonction du grade d'infiltrat tissulaire, les patients ayant un pemphigus modéré à sévère (PDAI>15) ne présentaient pas un taux de CD83s (moyenne : 5.7 pg/mL) significativement différent de ceux ayant un pemphigus peu sévère (moyenne : 6.1 pg/mL) ; cependant, le taux de CD83s sérique à la phase active du pemphigus était corrélé significativement ($P : 0.030$) de manière négative avec le taux d'anticorps anti-Dsg3 circulant ($r : -0.43$; $R^2 : 0.19$) (**Fig. 30 H**).

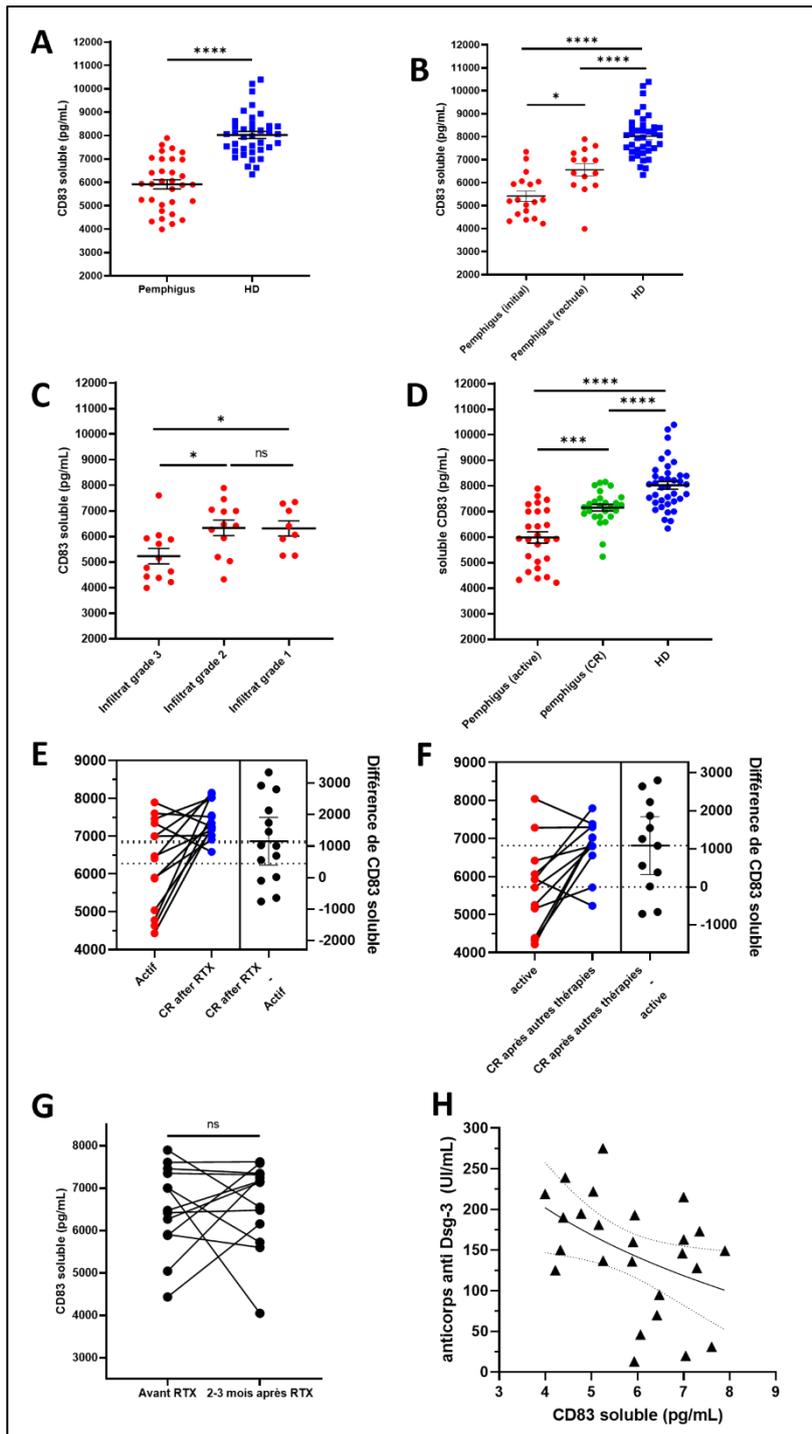


Figure 30. Etude du CD83 soluble sérique chez les patients ayant un pemphigus.

A. Comparaison du CD83s chez les patients ayant un pemphigus actif (n=32) et les donneurs sains appariés par l'âge. B (n=38). Comparaison du CD83s chez les patients ayant un pemphigus actif (n=32) en fonction de l'antériorité de la maladie. C. Comparaison du CD83s chez les patients ayant un pemphigus actif (n=32) en fonction du grade d'infiltrat histologique constaté sur les biopsies concomitantes au prélèvement sérique. D. Comparaison du CD83s chez les patients actifs et en rémission complète (n=26, les patients perdus de vue après traitement et ceux n'ayant pas atteint la rémission ont été exclus de l'analyse) et les donneurs sains (n=38). E. Evolution du CD83s avant et après traitement par RTX, et différence observée entre les 2 dosages (n=14). F. Evolution du CD83s avant et après traitement par autres immunosuppresseurs, et différence observée entre les 2 dosages (n=12). G. Evolution du taux de CD83s pendant déplétion périphérique des LB par RTX (n=13). H. Corrélation du taux de CD83s et des anticorps anti-Dsg3 (n=25 ; les patients sans anticorps anti-Dsg3 sériques dosables par ELISA ont été exclus). Test T non appariés (A,B,C,D), tests T appariés (D,E,F,G), Corrélation de Pearson (H). ns, $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Les PBMC de patients ayant un pemphigus actif en culture ont une production augmentée d'Ig totales et d'anticorps anti-Dsg lors de l'ajout d'anticorps anti-CD83

Au vu des résultats suggérant l'implication de CD83m exprimé par les LB et du CD83s dans l'activité du pemphigus, nous avons étudié l'effet d'un anticorps polyclonal anti-CD83 humain sur l'activation des LB de 5 patients qui avaient un pemphigus actif. Les PBMC étaient cultivées pendant 10 jours, en condition d'allostimulation par l'adjonction aux PBMC de patients de PBMC de 2 donneurs sains préalablement irradiées. A J6, une partie des PBMC étaient prélevées pour analyser l'expression de marqueurs d'activation (CD69,CD86) et du CD83m par les LB par FACS (stratégie de gating, **supp Data 11**). L'expression de CD83m par les LB augmentait rapidement en culture de PBMC ou de LB triés, en quelques heures, d'une manière similaire au marqueur d'activation précoce CD69, chez les donneurs sains en absence de stimulation : les niveaux d'expression étaient plus importants et restaient élevés plus longtemps en condition de stimulation du BCR ou du TLR9 (**supp Data 12**). De manière concordante, l'expression des marqueurs d'activation CD69, CD83 et CD86 par les LB de patients était augmentée en culture de PBMC allostimulées et cette expression persistait à des niveaux élevés de manière prolongée au 6^{ème} jour de culture (**Fig. 31 A-C**). A ce terme, il n'y avait pas de différence significative d'expression de CD69 par les LB entre les différentes conditions (**Fig. 31A**) ; la proportion de LB exprimant CD86 était cependant significativement plus importante en présence d'anticorps anti-CD83 (**Fig. 31B**). La proportion de LB exprimant CD83m n'était pas modifiée par l'anticorps anti-CD83 polyclonal (**Fig. 31C**) ; ainsi, l'anticorps anti-CD83 polyclonal ne semblait pas interférer avec la détection du CD83m ou entraîner son internalisation. D'autre part, la moyenne d'intensité d'expression de CD83m dans les différentes conditions n'était pas significativement différente (données non présentées). L'anticorps anti-CD83 était responsable d'une augmentation de la production totales d'IgG et d'IgM par les LB mesurée par ELISA au 10^{ème} jour de culture (**Fig. 31D-E**) ; cependant, seule la différence de production d'IgG totale était statistiquement significative (**Fig. 31E**). Le taux de CD83s était augmenté dans les condition allostimulées et l'ajout d'anticorps anti-CD83 polyclonal était responsable d'une diminution significative du taux de CD83s qui se rapprochait du taux observé en absence d'allostimulation (**Fig. 31F**) ; le taux de CD83s était ainsi significativement abaissé en présence d'anticorps anti-CD83 par rapport à la condition contrôle en présence de gammaglobulines de lapin ($P : 0.048$) à J10. Ainsi, l'anticorps anti-CD83 était responsable d'une absence d'augmentation du taux de CD83s en culture par une captation par l'anticorps, par une liaison aux cellules exprimant le CD83m, ou bien par une diminution de sa production. En comparaison au milieu seul, l'ajout de l'anticorps anti-CD83 ou de son contrôle n'était pas à l'origine de différence significative de bruit de fond lors des dosages par ELISA des IgG, des IgM totales (**Supp Data 13**) et du CD83s (données non intégrées au manuscrit). Afin de voir si cette activation touchait les LB autoréactifs présents au sein des PBMC de patients ayant un pemphigus actif, nous avons mesuré par ELISA le taux d'anticorps anti-Dsg1 et d'anti-

Dsg3 dans les différentes conditions de culture. Compte tenu du faible nombre de LB autoréactifs circulants au sein des LB totaux, aucun signal n'était obtenu sur des surnageants non concentrés compte tenu de cette faible abondance. Nous avons donc réalisé les ELISA sur des surnageants concentrés à 10x au moyen de dispositifs d'ultrafiltration. Nos résultats suggèrent que les anticorps anti-Dsg1 et 3 étaient mesurables en ELISA sur ces surnageants concentrés par la mise en évidence de résultats supérieurs au contrôle négatif, notamment dans les conditions allostimulées. Les valeurs les plus importantes d'anticorps anti-Dsg1 et 3 étaient obtenues, pour les 3 patients, dans la condition traitée par anticorps anti-CD83 polyclonal (**Fig. 31G**).

Ainsi, interférer avec CD83 sur des cultures de PBMC au moyen d'un anticorps anti-CD83 polyclonal n'entraînait pas de déplétion B ou de déplétion du CD83m sur les LB, mais était responsable d'une diminution du CD83s, d'une augmentation de l'activation des LB de par l'augmentation de marqueurs d'activation, tels que CD86, d'une augmentation de la production d'Ig totales et d'une production plus importante d'autoanticorps anti-Dsg.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'effet de l'anticorps anti-CD83 était limité aux conditions responsables d'une forte activation, telle que l'allostimulation. Des résultats similaires ont été obtenus en absence de d'allostimulation sur les PBMC d'un seul patient ayant un pemphigus actif (**Fig. 32**). Le traitement par anticorps anti-CD83 polyclonal de PBMC en culture sans allostimulation montrait une expression discrètement plus élevée de CD86 par les LB, une production plus importante d'IgG et d'IgM totales ainsi qu'une baisse du CD83s aux différents temps de culture (**Fig. 32 A-C**). Ainsi, l'interférence de l'anti-CD83 polyclonal avec le couple CD83m/CD83s ne semble pas nécessiter d'activation forte pour entraîner une augmentation de la production d'anticorps par les LB.

Alors que les LB de patients expriment CD83m de manière basale au contraire des LB de donneurs sains (**Fig. 26**), l'expression de CD83m par les LB de donneurs sains augmente cependant rapidement en culture (**Supp Data 12**). Ainsi, nous avons cherché à savoir si les résultats obtenus avec les PBMC de donneurs sains seraient similaires à ceux obtenus avec les PBMC de pemphigus. Malgré l'expression de CD83 par les LB de donneurs sains en culture, il n'y avait pas de modification significative de la production d'IgG ou d'IgM lors de la culture de PBMC de donneurs sains, non stimulées ou stimulées par CPG, en présence d'anticorps anti-CD83 polyclonal (**Supp data 14**).

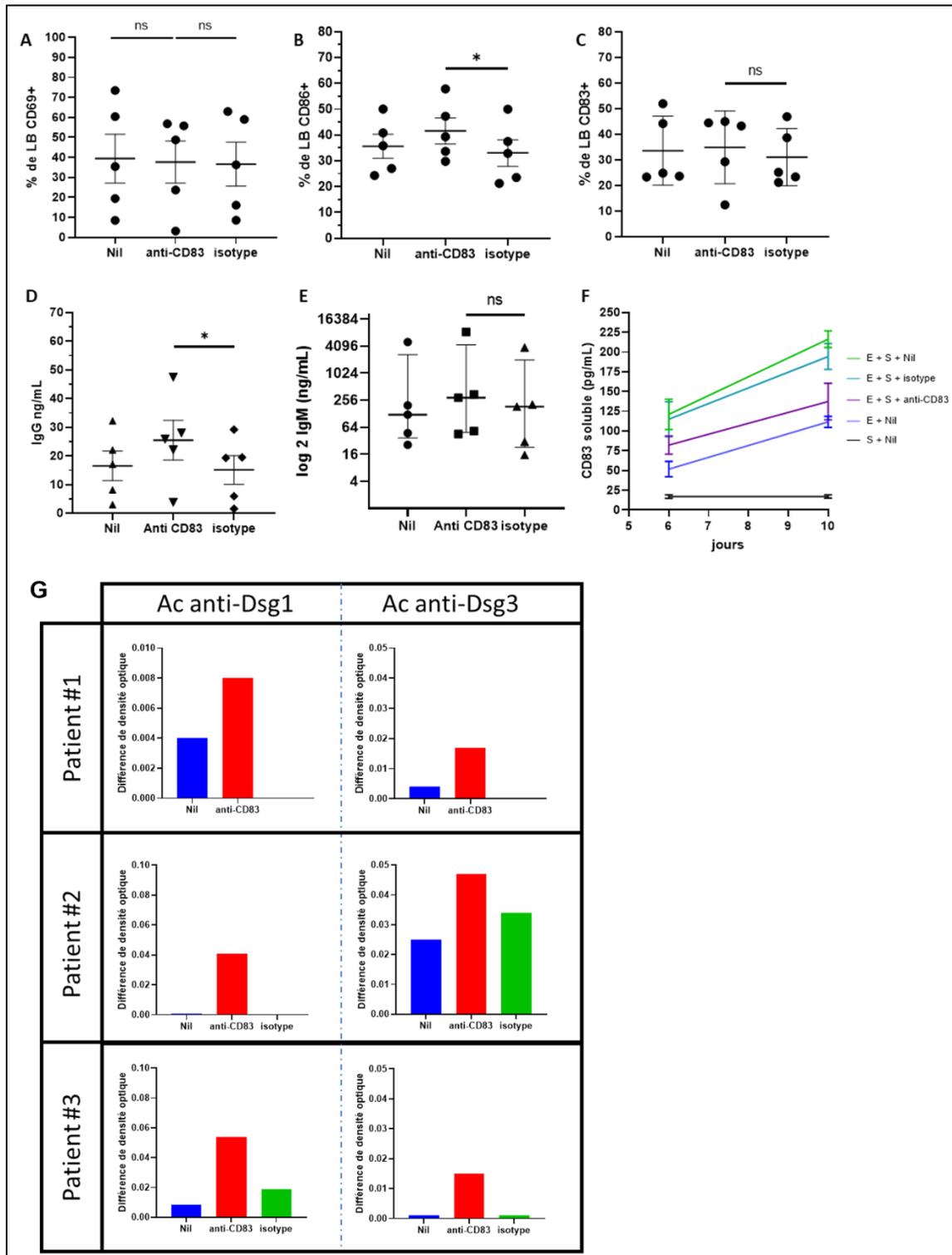


Figure 31. Effet d'anticorps anti CD83 polyclonal sur l'expression des marqueurs d'activation et la production d'immunoglobulines par les LB en culture de PBMC allostimulées.

Résultats d'expériences indépendantes menées sur PBMC de patients ayant un pemphigus actif (n=5 (A-E), n=4 (F), n=3 (G)) allostimulées, en absence de traitement (Nil), en présence d'anticorps polyclonal de lapin anti-CD83 humain (Anti-CD83) ou de gammaglobulines de lapin (Isotype). Expression à J6 des marqueurs CD69, CD86, CD83 par les LB (A-C). IgG et IgM totales des surnageants prélevés à J10 de culture mesurées en ELISA (D-E). CD83 soluble des surnageants prélevés à J6 et J10 de culture mesuré en ELISA (F). Taux d'anticorps anti-Dsg1 et anti-Dsg3 des surnageants prélevés à J10 évalués par ELISA et présentés en différence de densité optique par rapport au contrôle négatif (G). Données présentées sous forme de moyennes +/- SEM (A-D) et médiane +/- IQR (E). Tests statistiques : T test apparié (A-D) et Test des rangs signés de Wilcoxon (E) ; ns : $P > 0.05$ * $P < 0.05$

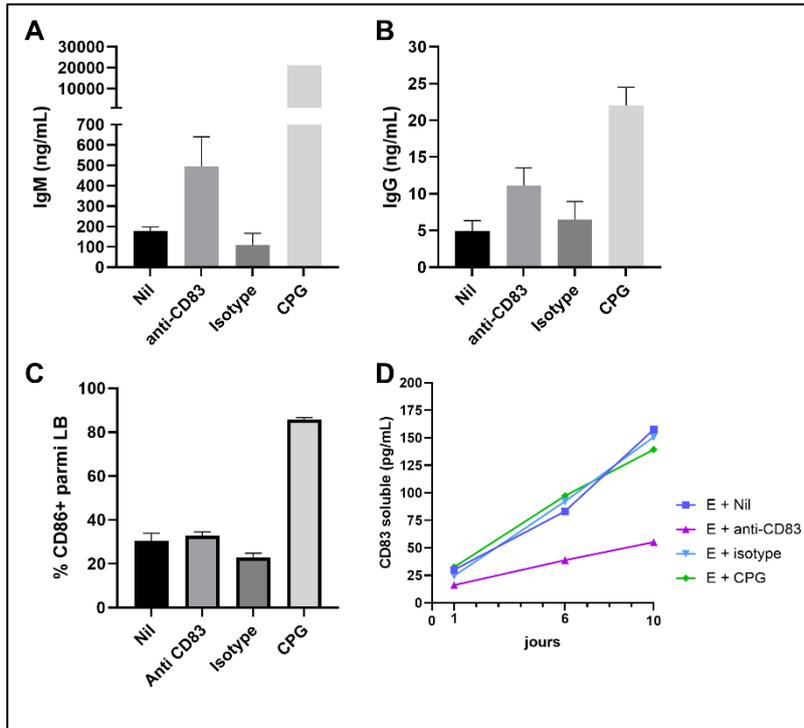


Figure 32. Effet d'anticorps anti CD83 polyclonal sur l'expression des marqueurs d'activation et la production d'immunoglobulines par les LB en culture de PBMC de patient pemphigus sans allostimulation. Résultats d'une seule expérience menée sur PBMC d'un patients ayant un pemphigus actif, en absence de traitement (Nil), en présence d'anticorps polyclonal de lapin anti-CD83 humain (Anti-CD83), de gammaglobulines de lapin (Isotype) ou en présence de CPG (1 μ g/mL). IgG et IgM totales des surnageants prélevés à J10 de culture mesurées en ELISA (A, B). Expression à J6 de CD86 par les LB (C). CD83 soluble des surnageants prélevés à J1, JJ6 et J10 de culture mesuré en ELISA (D).

DISCUSSION

Les connaissances des mécanismes immunologiques participant à l'auto-immunité dans le pemphigus se sont considérablement accrues lors des dernières années. Alors que de nombreux acteurs immunologiques participent à l'auto-immunité dans le pemphigus, les LB restent la cible principale des thérapeutiques actuelles et en voie de développement, car ils sont responsables de la production d'auto-anticorps directement responsable de l'acantholyse, faisant du pemphigus un paradigme de maladie auto-immune B médiée. Les avancées de la dernière décennie ont abouti à l'utilisation de thérapeutiques ciblées visant à dépléter les LB, permettant ainsi de réduire drastiquement les auto-anticorps pathogènes. Cependant, un certain nombre de patients restent résistants au RTX ou connaîtront des rechutes à l'arrêt du traitement, nécessitant pour certains un traitement au long cours avec des réinjections séquentielles pour assurer une rémission de longue durée sous traitement. Ainsi dans le pemphigus, malgré les achèvements récents, la poursuite de l'étude des mécanismes responsables de la dérégulation de la balance immunitaire sous tendant l'initiation, la persistance et les rechutes de la maladie constitue un objectif majeur en vue d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ; mais aussi des marqueurs d'activité de la maladie à même d'orienter les praticiens sur les patient ayant un risque d'échec au RTX ou de rechute après traitement afin d'adapter les thérapeutiques initiales et d'entretien de manière personnalisée.

Notre étude avait pour objectif d'identifier des acteurs cellulaires surexprimées par les LB totaux et autoréactifs de patients ayant un pemphigus afin d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la dérégulation immunitaire associée au pemphigus et ainsi suggérer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Alors qu'il est maintenant bien démontré que CD83 joue un rôle important dans la présentation antigénique, l'activation et la survie des cellules immunitaires, nos résultats suggèrent l'implication du couple CD83m exprimé par les LB / CD83s dans l'activité du pemphigus.

Etude phénotypique et transcriptomique des LB de patients ayant un pemphigus actif, en rémission et de donneurs sains

L'intérêt porté à CD83 provenait des résultats obtenues par les analyses de RNA-seq comparant le transcriptomes de LB de patients et de donneurs sains et de sc-RNA-seq comparant les transcriptomes de LB Dsg3+ et Dsg3- de patients et de donneurs sains. Ces analyses, visant à étudier spécifiquement les populations de LB responsables de la production des anticorps anti-Dsg3 n'avait encore jamais été réalisées dans le pemphigus sur l'ensemble du transcriptome. En 2019, Hébert *et al* avait néanmoins déjà comparé le transcriptome de LB Dsg3+ et Dsg3- en se restreignant à 31 gènes impliqués dans la production de cytokines inflammatoires (323).

Nos analyses du transcriptome par RNA-seq et du phénotype par Cytof des LB totaux ont permis de confirmer la disparité transcriptomique et phénotypique des LB des patients et des donneurs sains, mais aussi des patients en fonction du stade actif ou non du pemphigus.

Les données de Cytof suggèrent l'existence de différents clusters de LB chez les patients actifs et chez les patients en rémission. Ainsi, plusieurs sous-populations de LB contribueraient au maintien de l'auto-immunité responsable de l'activité de la maladie mais aussi au maintien de la rémission à distance du traitement. Ces résultats suggèrent notamment une plus grande proportion parmi les LB de clusters dont l'expression protéique oriente vers des LB immatures chez les patients en rémission à M36. Une analyse complémentaire des données de Cytof est en cours pour compléter ces résultats en étudiant plus spécifiquement les différents stades de maturation des LB (en fonction de l'expression des marqueurs IgD, IgM, IgG, CD24,CD38) chez les patients et les donneurs sains. Nos résultats actuels semblent conforter ceux d'études antérieures montrant que les modifications phénotypiques des LB persistent à distance du traitement et que le traitement par RTX est responsable d'une repopulation B circulante où prédomine des formes immatures de LB, notamment CD27-, naïfs ou transitionnels du fait d'un blocage persistant de la maturation (256,324). Cependant, alors que les Bregs ont été montrés comme augmentés lors de la rémission par rapport aux stades actifs (324), nos résultats de Cytof ne mettaient pas en évidence de différence d'expression de l'IL-10 entre les clusters prédominant chez les patients actifs et en rémission. D'autre part, CD39 semble moins exprimé dans les clusters prédominant chez les patient en rémission. Alors que CD39 est habituellement plus exprimé par les LB matures, une expression plus faible de CD39 pourrait ainsi être lié à l'état d'imaturité des LB après traitement par RTX. Cependant, ces clusters exprimant plus faiblement CD39 pourraient aussi être en lien avec l'activité de la maladie car, dans la PR, l'expression de CD39 par les LB après traitements serait corrélée à la réponse au traitement (455). L'expression de CD21, habituellement surexprimé par les LB matures, semble moins importante au sein des clusters de LB des patients au stade actif. Des modifications de l'expression de CD21 par les LB du pemphigus n'ont jamais été mises en évidence ; ainsi une réanalyse est en cours pour vérifier l'existence d'une expression différente de CD21 par les LB des patients au stade actif et en rémission. En effet, des populations de LB CD21^{faible} sont décrites comme associées à l'activité d'autres maladies auto-immunes. Notamment, le taux de LB CD27-CD21- circulant a été corrélé à l'activité du LES (456). Alors que ces clusters expriment moins CD21, ils expriment l'IgD et le CD38 et pourraient ainsi constituer des populations de LB transitionnels participant à l'auto-réactivité. Néanmoins, ils pourraient aussi représenter des populations de LB mémoires atypiques CD20+CD21^{faible}CD27-, population déjà décrite comme augmentée dans le sang circulant de patients ayant des pathologies infectieuses chroniques et auto-immunes (457).

L'analyse du transcriptome par RNA-seq des LB totaux triés a permis d'identifier 4 gènes codant des protéines associées à la membrane dont le niveau de transcription était significativement plus important chez les patients ayant un pemphigus actif que chez les donneurs sains. Hormis CD83, les 3

autres gènes différentiellement traduits codent des protéines intracellulaires associées à la membrane dont l'implication dans l'auto-immunité est plus difficile à établir sur les données de la littérature. Le gène SNX9 (Sorting Nexin 9) code une protéine de la famille des nexines (458). Les membres de cette famille contiennent un domaine de liaison aux phosphoinositides et SNX9 contient un domaine d'homologie SRC près de son extrémité N-terminale et aurait des interactions avec plusieurs partenaires membranaires et du cytosquelette d'actine. SNX9 se lie ainsi à des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire, recrute des composants des machineries d'endocytose et de régulation de l'actine, et s'interface avec des GTPases et des kinases de signalisation. Plusieurs études récentes ont élargi le rôle de la SNX9 en suggérant qu'elle coordonne le trafic membranaire et la dynamique de l'actine dans divers processus cellulaires tels que l'endocytose, la macropinocytose, la migration, l'invasion et la division cellulaire. CYLD est une déubiquitinase intracellulaire, identifié initialement dans une maladie génétique, la cylindromatose. Par son activité de déubiquitinase, CYLD a un rôle de gène suppresseur de tumeur, impliqué dans de nombreuses pathologies tumorales notamment des hémopathies B (459). CYLD inhibe notamment IKK et NFκB en éliminant les chaînes de polyubiquitine liées à TRAF2, TRAF6 et NEMO (460,461). PTP4A1 est un gène codant pour la tyrosine phosphatase de type IVA 1. Les phosphatases de la famille PTP4A ont une grande homologie et participent à large panel d'activités cellulaires incluant la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion (462). Ainsi les phosphatases de la famille PTP4A sont rapportées comme participant à des voies de signalisation modifiées dans certaines pathologies tumorales. CD83 a donc été considéré comme le gène différentiellement exprimé avec le plus d'intérêt dans le contexte du pemphigus car il code pour une protéine exprimée à la membrane et est impliquée dans la régulation de la fonction et de la maturation d'un nombre important de cellules immunitaires, notamment des LB (378).

L'analyse par sc-RNA-seq des LB CD19+Dsg3+ a été rendue possible dans le pemphigus par l'existence démontrée de LB Dsg3+ à taux faible, aussi bien chez les patients (0.2% des LB) que chez les donneurs sains (0.1% des LB) ; ainsi que par la résurgence à distance de la déplétion par RTX de LB Dsg3+ chez les patients en rémission à des taux circulants comparables aux patients actifs (323). Les résultats de sc-RNA-seq des LB Dsg3+ ont montré que la transcription de CD83 est plus importante au sein des LB Dsg3+ de patients que de donneurs sains. CD83 pourrait ainsi jouer un rôle clé dans la régulation de la balance immunologique dans le pemphigus. Cette différence de transcription de CD83 persiste lors de la comparaison des LB Dsg3+ des patients en rémission à M36 et des donneurs sains. Hébert *et al* (323) avaient montré en 2019 que le profil d'expression génique des LB autoréactifs anti-Dsg3+ étaient peu modifié après traitement par RTX ; avec uniquement des différences de transcription pour les gènes codant l'IL-1β et le CD27. Bien que certains gènes, comme CD83, ne montrent pas de différence de transcription entre les patients actifs et en rémission, de nombreux autres gènes (Supp Data 2) semblent cependant modifiés après la rémission suite au traitement. La persistance de l'augmentation d'expression de CD83 par les LB des donneurs sains en comparaison aux patients ayant un pemphigus

contrôlé à M36 de traitement ne permet pas de conclure sur le rôle de CD83 dans le pemphigus, qui pourrait aussi bien constituer un facteur d'activité qu'un facteur favorisant la réponse ; comme cela a été suggéré par des données de qPCR réalisé sur des PBMC totales dans la PR où la surexpression de CD83 étaient associée à une rémission sous traitement par abatacept (429).

Expression de CD83m par les LB circulants et infiltrant les tissus lésés de patients ayant un pemphigus

Nos résultats transcriptomiques ont été confirmés par la mise en évidence de la surexpression de CD83m par les LB de patients ayant un pemphigus actif en comparaison aux donneurs sains. La très faible expression de CD83m par les LB de donneurs sains était en accord avec les données de la littérature ayant montré que CD83m peut être exprimé par un large panel de cellules immunitaires dans des conditions d'activation mais que son expression était absente au repos (384-386). La surexpression de CD83m par les LB est maintenant bien décrite dans les hémopathies lymphoïdes ; CD83 étant à l'étude comme marqueur diagnostique et comme cible thérapeutique dans certaines de ces pathologies (391). Cependant, l'expression membranaire de CD83 par une partie des LB de patients n'avait pas été rapportée dans le cadre de pathologies auto-immunes. Dans le pemphigus actif, les LB constituaient notamment la majeure partie des leucocytes circulant exprimant CD83m. En condition physiologique, les LB expriment CD83 après avoir acquis un BCR fonctionnel, notamment par des LB immatures au sein des centre germinatifs médullaires et des organes lymphoïdes secondaires (373, 383). Nos résultats montrent que les LB CD83+ circulant dans le pemphigus sont en grande partie des LB naïfs, ce qui pourrait suggérer que leur présence en condition pathogène soit lié à une plus grande stimulation antigénique au sein de structures lymphoïdes, responsables d'une recirculation plus importante de LB CD83+. D'autre part, la surexpression de CD69 par les LB CD83+ en comparaison au LB CD83- chez les patients s'accorde avec les résultats de la littérature décrivant ces 2 marqueurs comme des marqueurs d'activation précoce du fait de leur cinétique d'expression lors de la stimulation en culture (403). Nos résultats montrent que la proportion de LB exprimant CD83m diminue lors de la rémission du pemphigus après traitement sans pour autant atteindre le taux d'expression des donneurs sains. Cette surexpression de CD83m au stade actif et de rémission du pemphigus concorde avec les données transcriptomiques montrant la persistance d'une transcription plus importante du gène de CD83 chez les patients en rémission en comparaison aux donneurs sains.

D'autre part, nous avons montré par co-immunofluorescence que des LB exprimant CD83+ sont présents au sein de structures ectopiques lymphocytaires, dont il a été montré qu'elles comprennent les différents stades de maturation des LB et des LB autoréactifs (282). Afin d'étudier la présence de LB CD83+ au sein des tissus lésés, nous avons étudié la présence, la densité et la composition de ces structures lymphocytaires dans un large série de biopsies de pemphigus. En utilisant une méthode similaire à celles utilisés dans la littérature, nos résultats montraient des proportions légèrement

supérieures d'infiltrat de grade II et de grade III comparés aux résultats de l'étude de Zhou *et al* (grade II : 70.7% vs 66.4% ; grade III : 42.7% vs 12.4%) (282). Ces différences peuvent être expliquées par les limites techniques liées à la méthode de comptage du nombre de cellules sur le rayon de la zone infiltrée. Considérant nos résultats et ceux de la littérature, il semble donc qu'une part importante des tissus de pemphigus présente des infiltrats lymphocytaires denses au niveau des zones lésées. L'architecture des infiltrats décrits dans notre série montrait comme dans celle de Zhou *et al*, des infiltrats d'architecture variable (sans architecture épars, nodulaires, diffus), de même qu'un renforcement périvasculaire et péri annexiel fréquent. Bien que les méthodes d'évaluation de la densité diffèrent entre notre travail et celui de Zhou *et al* (282), nous n'avons pas mis en évidence de différence de densité d'infiltrat entre les PV et les PS ou entre les muqueuses et la peau. Par ailleurs, en étudiant les lames colorées au bleu de toluidine, habituellement réalisées avant l'analyse par IFD sur des tissus congelés, nous avons montré une importante diminution de la densité des infiltrats en peau péri-lésionnelle ; la biopsie pour l'IFD étant habituellement réalisée un peu plus à distance des tissus présentant des lésions acantholytiques (bulles/érosions) que celle réalisée pour l'analyse histologique. Ainsi, bien que le pemphigus soit une maladie systémique, les lésions cliniques évoluées et les infiltrats lymphocytaires les plus denses semblent se développer aux mêmes sites. Nos résultats d'IHC montraient des proportions similaires de LT, de LB et de plasmocytes par rapport à l'étude de Zhou *et al* ; la proportion de biopsies présentant des cellules mononuclées exprimant CD21 était cependant inférieure dans notre étude (16.1% vs 33.3%). Devant le peu de biopsies exprimant CD21 et la paucité de surface marquée par le CD21, les infiltrats de notre série ne pouvaient satisfaire à la définition de TLS (283) ; ainsi, nous n'avons pas réalisé de marquage permettant de visualiser les HEVs, alors que l'étude de Zhou *et al* (282) rapportait la présence de HEVs dans 37.9% des infiltrats. Compte tenu de la définition des TLS et des infiltrats ELS-like, certains infiltrats décrits par Zhou *et al* comme des infiltrats ELS-like auraient pu souscrire à la définition de TLS compte tenu de la présence de cellules CD21+ et d'HEVs. Nos résultats d'IHC ne permettent pas d'évoquer une organisation supérieure au stade d'ELS-like pour les infiltrats présents en peau lésée de pemphigus. Alors que Zhou *et al* suggéraient une présence plus importante de LB, de plasmocytes, et de HEVs dans les lésions muqueuses, nos résultats ne montrent pas de différence significative entre la peau et les muqueuses lésées. La surface marquée par CD83 était inférieure à celles marquées par CD3, CD20 et CD138, montrant que dans la peau, comme dans le sang circulant, CD83 n'est exprimé que par une faible proportion des cellules immunitaires. La peau normale et inflammatoire, notamment dans le psoriasis et le lichen, peut être infiltrée par des LCs et des DCs exprimant CD83 (463,464). Ainsi, une part non évaluée dans nos monomarquage par IHC correspond vraisemblablement à des cellules tissulaires activées non-B.

La corrélation positive de la surface marquée par le CD83 et par le CD138 dans notre étude pourrait faire suggérer une expression prépondérante de CD83 par les plasmocytes au sein des LB, bien que les LB circulants CD83+ soient majoritairement constitués par des LB naïfs. Alors qu'il existe une

maturation des LB au sein des tissus lésés de pemphigus aboutissant à la présence de cellules capables de produire des anticorps anti Dsg1/Dsg3 (282,297), et que CD83 est exprimé par les LB des centres germinatifs des OLS et influe sur la maturation des LB (398,399), cette corrélation entre la surface marquée par CD83 et CD138 pourrait plus vraisemblablement souligner l'importance de l'expression de CD83 par les divers intervenants cellulaires dans le processus de maturation locale des LB vers les stades sécrétant les auto-anticorps.

Alors que CD83m n'est exprimé que par une faible proportion des LB circulants et infiltrants les tissus lésés, la différence d'expression génique montrant une transcription plus importante du gène de CD83 par les LB autoréactifs Dsg3+ chez les patients ayant un pemphigus suggère que cette population de LB exprimant CD83m pourrait contenir les LB autoréactifs. Ainsi, CD83m pourrait constituer une cible thérapeutique d'intérêt pour dépler les LB autoréactifs. Des mAb antiCD83 ont déjà été développés et testés *in vitro* pour dépler les LB qui surexpriment CD83 dans certaines hémopathies ou les DC pour prévenir les rejets de greffe (391, 414). En 2018, Wong *et al* ont montré qu'un mAb anti-CD83 humain était capable d'induire une réduction quasi complète de la production d'Ig totales par les LB, par un mécanisme d'ADCC, dans des expériences de culture de PBMC allostimulées, sans induire de déplétion totale des LB (414). Les résultats de la littérature et nos résultats montrent qu'une part importante des LB exprime CD83 sur des temps > 4 jours en culture de PBMC en présence de PBMC allo-incompatibles ou de stimulation par CD40L (414), expliquant l'importance de la diminution de la production d'Ig en cas de utilisation de mAb modifiés pour favoriser l'ADCC des LB exprimant CD83. Compte tenu de la faible proportion de LB exprimant CD83 dans le pemphigus, l'utilisation *in vivo* d'un mAb entraînant la déplétion des LB CD83+ dans le pemphigus ne devrait donc pas entraîner de diminution aussi importante des Ig totales et pourrait avoir un effet plus ciblé sur les cellules productrices d'autoanticorps anti-Dsg3. Alors que les DSG3-CAAR T-cells ciblant les LB exprimant des BCR spécifiques de Dsg3 sont en cours d'étude dans le pemphigus (NCT04422912), nos données pourraient suggérer l'intérêt de l'utilisation de CAR T-cells ciblant CD83 dans le pemphigus, telles que celles développées pour prévenir le rejet de greffe en dépliant les LT CD4+ conventionnels allo-immun et les DCs pro inflammatoires (465). Dernièrement, des anticorps bispécifiques ont été développés dans les hémopathies B pour favoriser la destruction des cellules tumorales par les LT en favorisant leur rapprochement (anticorps bispécifique anti-CD3/CD19) ou induire leur apoptose par la fixation de l'anticorps (anticorps bispécifique anti-CD95/CD20) et sont en cours de développement dans d'autres utilisations (466–468). L'utilisation d'anticorps bispécifiques anti-CD19/CD83 pourrait ainsi permettre de dépler les LB CD83+ en réduisant l'action de l'anticorps sur les autres cellules CD83+, notamment les DC activées et les Treg.

Expression de CD83m et de CD83s en culture

Nos résultats concernant l'expression de CD83m par les LB en culture sont compatibles avec ceux antérieurement publiés dans la littérature montrant: 1) une expression rapide en quelques heures de CD83m en absence de stimulation, qui est augmentée en présence d'une stimulation du BCR, des TLR, ou par les LT (373,384,400,401) ; 2) une expression de CD83m inductible sur les différents stades de maturation des LB (naïfs, mémoires) (385) ; 3) une expression prolongée de CD83m par les LB lors de l'engagement du CD40 suite à la coopération LB-LT (403) 4) une cinétique d'expression de CD83 proche de celle de CD69, en faisant un marqueur précoce de l'activation des LB (403). Cette induction rapide d'expression par les LB serait en lien avec une activation importante du promoteur du gène de CD83 persistante aux différents stades de maturation des LB (385,402). Dans le contexte du pemphigus, l'expression de CD83m est supportée par une transcription accrue du gène de CD83 par les LB de patients actifs par rapport aux donneurs sains, qui persiste chez les patients en rémission à M36 de traitement.

Nos résultats de culture de PBMC de patients ayant un pemphigus actif sans stimulation et en condition d'allostimulation suggèrent que l'anticorps anti-CD83 polyclonal de lapin a un effet sur l'activation des LB de patients ainsi que sur la production d'Ig totales et d'auto-anticorps anti-Dsg. Ces expériences ayant été menées sur des PBMC, il n'est pas possible d'attribuer ces résultats à la seule interaction des anticorps anti-CD83 avec les LB car l'effet de stimulation pourrait être médié par d'autres cellules immunitaires pouvant exprimer CD83, telles que les DC activés et les LT CD4+, notamment les Treg (375, 387). En effet, bien que la proportion de DC et de Treg soit inférieure à celles des LB dans le sang circulant, nos résultats ont montré que jusqu'à 3% des leucocytes CD45+CD19-CD3+ des PBMC du sang de patients ayant un pemphigus actif exprimaient CD83m. Or, plusieurs travaux menés sur des souris transgéniques ont montré l'impact de l'absence ou de la surexpression de CD83 sur le phénotype des DC et sur la fonction suppressive des Treg (378, 393, 397). Les données de la littérature issues de modèles de souris KO ont cependant aussi montré que l'absence du gène CD83 sur les LB était responsable de modifications d'activation des LB et du switch isotypique, démontrant l'implication directe de CD83 sur la fonction du LB (410). Ainsi, les changements observés par l'ajout d'anticorps anti-CD83 polyclonal pourraient résulter d'un effet direct sur les LB exprimant CD83m et d'un effet indirect par la modification du fonctionnement d'autres acteurs cellulaires. L'absence de mise en évidence d'un effet identique sur les PBMC en culture de donneurs sains, qui n'expriment pas CD83 à l'état basal mais l'exprime rapidement en culture, suggère en effet que la seule expression transitoire de CD83m par les LB ne permet pas d'augmenter la production d'Ig totale, suggérant un mécanisme ne dépendant pas uniquement de l'expression de CD83m.

Les données de la littérature ont montré que CD83 participait à l'augmentation et au maintien de l'expression de CD86 et de CMHII par les LB (401,407,408, 410) ; nos résultats n'ont cependant pas

mis en évidence d'augmentation d'expression de CD86 par les LB CD83+ en comparaison au LB CD83- chez les patients ayant un pemphigus actif. Les résultats des cultures de PBMC de patients mettaient cependant en évidence une augmentation de l'expression de CD86 à J6 en présence d'anticorps anti-CD83. Ainsi, l'anticorps anti-CD83 utilisé dans nos travaux serait responsable d'une augmentation de molécules de costimulation sur les LB qui pourrait être impliqué dans l'augmentation de la production d'IgG et d'IgM. Sur des cultures de LB triés provenant de souris mutantes CD83 -/- Kretschmer et al ont montré une augmentation de la production d'IgG (401). Cependant, les modèles de souris KO où seuls les LB étaient CD83 -/- n'ont pas mis en évidence de changements des taux circulants d'IgG et d'IgM (410). Ainsi, au vu des données de la littérature sur le fonctionnement de CD83 exprimé par les LB, nos résultats ne permettent pas de savoir si l'anticorps anti-CD83 polyclonal utilisé dans a agi comme un activateur ou comme un inhibiteur de CD83m. Dans notre travail, l'ajout d'anticorps anti-CD83 polyclonal augmentait le taux d'IgG et d'IgM à J10, mais la différence avec la condition contrôle n'était significative que pour les IgG. Il n'existe pas de données de la littérature permettant de comparer nos résultats de traitement par anti-CD83 sur PMBC humaines en condition non tumorale. Cependant, plusieurs travaux ont montré que l'injection d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux de rat anti-CD83 murin à des souris était responsable d'augmentation des IgG, notamment des IgG1, sans augmentation significative des IgM (400,401,413).

Les mécanismes d'action de l'anticorps polyclonal anti-CD83 responsable de la stimulation des LB de patients sont d'autant plus difficiles à affirmer que nous avons montré que, bien que n'étant pas responsable d'une diminution de l'expression de CD83m par les LB, l'anticorps anti-CD83 polyclonal était responsable d'une diminution du taux de CD83s en culture. Hors, CD83s aurait une activité immunomodulatrice et pourrait se lier à CD83m par des interactions homotypiques sur différentes cellules l'exprimant (418). L'effet observé pourrait ainsi dépendre du couple CD83m/CD83s plus que d'un effet isolé sur le CD83m. Nos résultats ne permettent cependant pas de suggérer le mécanisme responsable de la baisse du taux de CD83s en présence d'anticorps anti-CD83. Les hypothèses possibles quant à la diminution du CD83s en culture sont une diminution de la production, une dégradation augmentée dans le milieu de culture, ou une fixation cellulaire. Nos résultats ne permettent pas d'étayer l'une ou l'autre de ces hypothèses ; notamment, concernant une éventuelle fixation cellulaire, il n'y avait pas à J6 de culture de différence concernant la proportion de LB exprimant CD83m ou de l'intensité moyenne de marquage du CD83m. Alors qu'une grande partie des données sur le rôle de CD83m provient de modèle murins, notamment de lignées CD83 -/- n'exprimant ni CD83m ni CD83s, de plus amples expérimentations prenant en compte aussi bien CD83m que CD83s devraient être menées chez l'humain pour comprendre le rôle de chacune de ses formes sur le fonctionnement des LB.

CD83s sérique dans le pemphigus

Alors que le couple CD83m/CD83s pourrait influencer sur la régulation de la fonction du LB, nous avons mis en évidence que le taux sérique de CD83s est diminué chez les patients ayant un pemphigus actif en comparaison aux donneurs sains. Un taux abaissé de CD83s a récemment mis en évidence dans d'autres pathologies auto-immunes ou immuno-allergique, telles que le diabète juvénile, la rhinite allergique ou une allergie alimentaire (422,430,431). Ainsi, l'altération des taux de CD83s sérique n'est pas spécifique au pemphigus et la fonction de régulation du CD83s pourrait être altérée dans des processus auto-immuns ou immuno-allergiques variés.

Dans notre étude, le taux de CD83s était significativement plus important chez les patients en rémission après traitement déplétant par RTX et par immunosuppresseurs conventionnels. Peu d'études se sont intéressées à l'évolution du taux de CD83s sérique au cours du traitement de maladies auto-immunes ou immuno-allergiques. Une évolution similaire du taux de CD83s a cependant été montrée sur un modèle expérimental d'uvéite auto-immune (432). Dans la PR, aucun changement significatif n'a été démontré après traitement ciblant les LT par abatacept alors que le taux de CD83s chez les patients serait supérieur aux donneurs sains (429). Nos résultats diffèrent donc de ceux obtenus dans la PR suggérant une variabilité liée aux différences immunologiques du pemphigus et de la PR, ou une variabilité d'effet en fonction de la thérapeutique utilisée en lien avec sa cible.

Alors que l'identification de marqueurs sériques pronostiques et d'activité est un des objectifs de la recherche translationnelle dans le pemphigus, un taux faible de CD83s a été identifié comme marqueur pronostic de développer des complications dans le diabète juvénile; d'autre part, le taux de CD83s serait corrélé au taux d'HbA1c dans le diabète et aux IgE spécifiques dans la rhinite allergique (422, 430, 431). Notre étude n'a pas permis de montrer de manière directe que CD83s pouvait constituer un facteur de gravité ou un facteur pronostic du pemphigus. En effet, nous n'avons pas montré de corrélation de CD83s avec le score d'activité du PDAI ; ce résultat pourrait cependant avoir été influencé par la méthode de calcul du PDAI qui confère un score plus important à l'atteinte muqueuse qu'à l'atteinte cutanée, dépendant plus du nombre de lésions que de la surface lésée ; ainsi que par l'inclusion dans l'étude de patients actifs, aussi bien au diagnostic qu'en rechute qui, bien qu'étant actifs, différaient quant à leur sévérité. Compte tenu de l'analyse rétrospective, étudier la corrélation du CD83s avec la surface lésée n'était pas possible. Une étude sur un effectif plus large et homogène pourrait ainsi compléter nos résultats. Néanmoins, nous avons montré que les patients actifs lors du diagnostic présentaient un taux de CD83s significativement plus bas que les patients actifs en rechute. D'autre part, nous avons montré que le taux de CD83s était corrélé négativement au taux de d'anticorps anti-Dsg3, dont le taux est corrélé à l'activité de la maladie (190,191), et que le taux de CD83s était significativement plus bas chez les patients ayant un infiltrat lymphocytaire en peau lésé plus important. Ces résultats montrent que CD83s est associé à plusieurs facteurs liés à l'activité immunologique du

pemphigus, suggérant fortement l'implication de la baisse du CD83s dans la dérégulation de la balance immunitaire dans le pemphigus. Alors, que cette dérégulation semble être présente dans d'autres pathologies auto-immunes ou immuno-allergiques, la question se pose de savoir si elle est présente dans d'autres maladies bulleuses auto-immunes. Nos résultats préliminaires dans la pemphigoïde bulleuse le suggèrent du fait d'un taux de CD83s sérique diminué chez les patients ayant une PB active par rapport aux donneurs sains et par la corrélation du taux de CD83s avec le taux d'IgE totale sérique au diagnostic (données non présentées). Nos résultats d'immunohistochimie ont montré une expression de CD83 par les cellules infiltrant les tissus lésés. Des infiltrats comprenant de nombreux leucocytes CD83+ ont aussi été montré dans le tube digestif sur des modèles murins de colite inflammatoire (435). De manière surprenante, les cellules muqueuses du tube digestifs de ces modèles de souris de colite inflammatoire relarguerait une quantité importante de CD83 lors de l'initiation de l'inflammation (435). Dans un modèle de rhinite allergique de souris, les cellules épithéliales des voies aériennes exprimeraient aussi CD83 et l'administration de CD83s atténuerait les symptômes cliniques ainsi que la réponse inflammatoire (437). Nos analyses d'immunohistochimie et de co-immunofluorescence n'ont pas mis en évidence d'expression de CD83 au sein des épidermes ou des muqueuses lésées, et nous n'avons pas pu doser le CD83s dans le liquide de bulle des patients ayant un pemphigus inclus prospectivement. Evaluer le CD83s produit au sein des bulles et par les muqueuses érosives dans les MBAI pourrait apporter des données d'intérêt. En effet, dans le modèle murin de rhinite allergique, la diminution des symptômes et de acteurs cellulaires circulants de l'inflammation faisait suite à l'instillation intranasale de CD83s, donc au niveau du tissu cible de l'inflammation. Plusieurs modèles murins de maladies auto-immunes ou inflammatoires ont montré que l'injection systémique de CD83s permettait de diminuer les symptômes de la maladie (435,441,452-454), démontrant notamment une augmentation des Treg et l'induction de DC tolérogéniques ; dans le modèle murins de lupus, une diminution des LB sécréteurs d'anticorps a aussi été mis en évidence (454). Ainsi, l'administration systémique ou locale au site d'inflammation de CD83s permet d'améliorer les symptômes de la maladie en induisant un environnement immunitaire tolérogène. Nos résultats mettant en évidence un taux de CD83s sérique abaissé chez les patients ayant un pemphigus actif par rapport aux donneurs sains et par rapport aux patients en rémission, permet de suggérer un intérêt thérapeutique de l'administration de CD83s dans le pemphigus. Evaluer la production de CD83s au sein des sites lésés (bulles, érosions) à différents stades d'évolution et au sein de la muqueuse buccale de donneurs sains permettrait d'obtenir des données préliminaires d'intérêt compte tenu des données sur modèle murin de rhinite allergique et de celles chez l'humain atteint de PR qui montrent un taux de CD83s élevé au niveau des sites d'inflammation.

Conclusions et perspectives

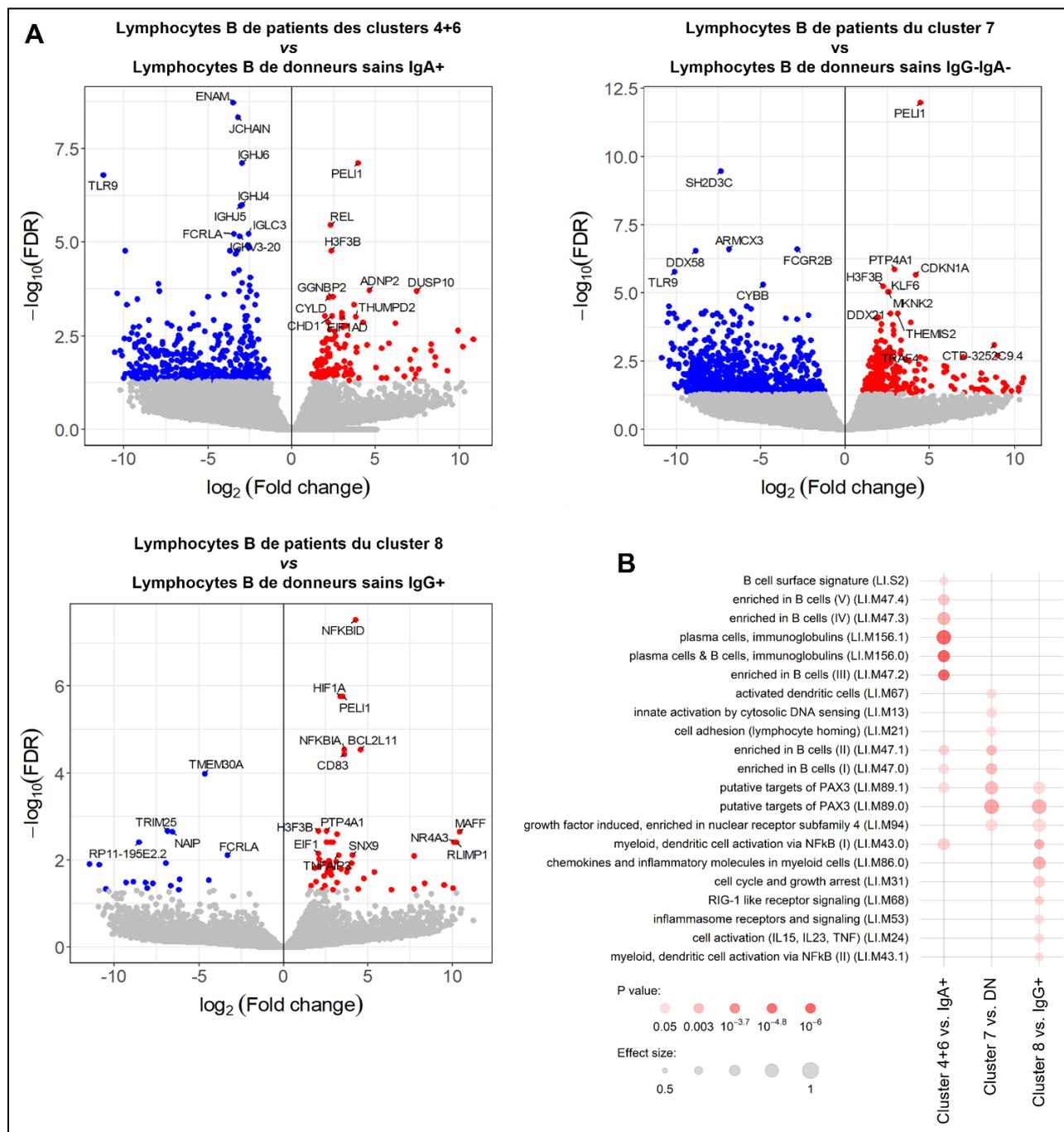
L'avènement des thérapeutiques ciblées a permis, notamment grâce au RTX, d'améliorer grandement le pronostic des patients atteints de pemphigus, permettant des taux de rémission complète importants dans la première année de traitement, une réduction des effets indésirables liés à l'utilisation de la corticothérapie systémique, et l'obtention de rémission complète au long cours nécessitant chez certains des réinjections séquentielles. Cependant, l'obtention d'une rémission complète et persistante sans traitement est souvent longue à obtenir et certains patients ne répondent pas ou rechutent avec les traitements actuels. Ainsi, il existe dans le pemphigus, comme dans les autres maladies auto-immunes un besoin de mieux comprendre les mécanismes responsables de la rupture de la tolérance immunitaire menant au développement de la maladie, participant au maintien de l'auto-immunité et aux rechutes. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de marqueurs pronostics de réponse au traitement est un point crucial pour offrir au patient une meilleure personnalisation des traitements.

C'est dans cet optique que l'étude des LB de patients ayant un pemphigus avant et après traitement par RTX par RNA-seq et sc-RNA-seq nous a permis d'identifier CD83 comme un acteur potentiellement important dans l'activité du pemphigus. En effet, le gène de CD83 est transcrit de manière plus importante par les LB de patients en comparaison aux donneurs sains et les LB Dsg3-spécifiques ont une transcription de CD83 plus importante chez les patients ayant un pemphigus que chez les donneurs sains. Nos résultats ont permis de mettre en évidence la surexpression de CD83m par les LB de patients ayant un pemphigus actif par rapport aux patients en rémission et par rapport aux donneurs sains et de montrer l'expression de CD83 par les LB au sein de structures ectopiques lymphocytaires présentes au sein des tissus lésés de pemphigus. Nous avons aussi montré que le taux de la forme soluble de CD83 était diminué chez les patients ayant un pemphigus par rapport aux donneurs sains, que ce taux était corrélé négativement avec le taux d'anticorps anti-Dsg3, et que la rémission de la maladie tendait le normaliser. Enfin, nous avons montré que le traitement de PBMC en culture par un anticorps anti CD83 polyclonal modifiait l'activation des LB de patients et leur production d'IgG, associé à une possible élévation de la production d'autoanticorps anti-Dsg3.

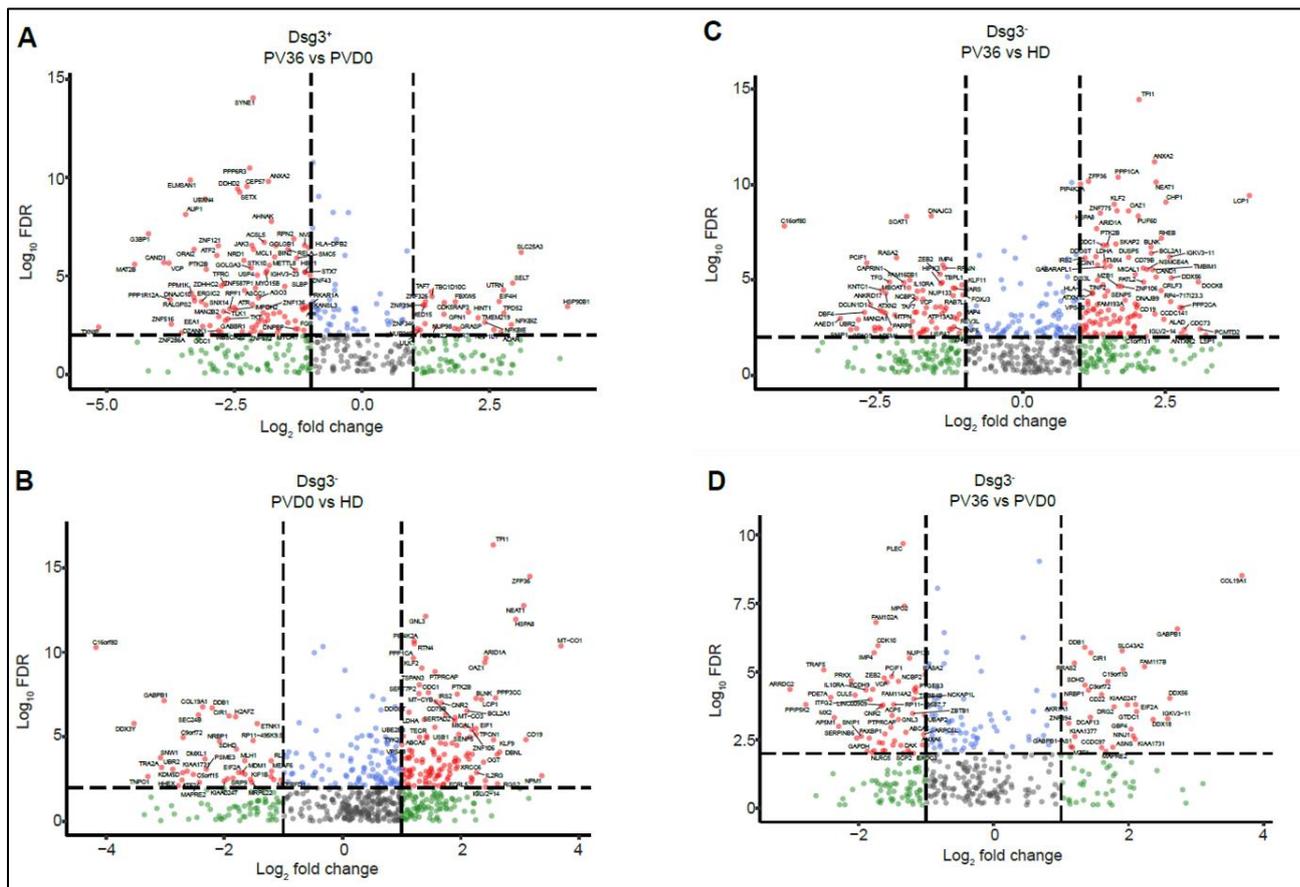
Nos résultats suggèrent donc fortement une implication du couple CD83m/CD83s dans l'activité immunologique du pemphigus. Au cours des dernières décennies, il est devenu clair que le CD83 joue un rôle particulièrement important dans l'orchestration des réponses immunitaires et dans l'induction subséquente de la résolution de l'inflammation. En particulier, CD83m est essentiel au développement des LT CD4+, intervient dans la maturation des DC et des LB, et participe à l'induction de mécanismes régulateurs visant à atténuer les réponses immunitaires. D'autre part, CD83s présente un potentiel thérapeutique dans la prévention et le traitement des maladies dysimmunitaires et des rejets de greffes, via l'induction de mécanismes régulateurs, intervenant notamment sur les Treg et les DC tolérogènes.

Ainsi, nos résultats viennent renforcer les données de la littérature quant à l'implication du couple CD83m/CD83s dans la dérégulation immunitaire responsable de l'auto-immunité. Ils permettent d'envisager CD83m comme cible thérapeutique visant à dépléter les LB exprimant CD83m dans le pemphigus au moyen d'anticorps monoclonaux ou de CAR T-cells, et suggèrent un possible intérêt thérapeutique de l'administration de CD83s pour moduler l'activité des cellules exprimant CD83 telles que les LB et les DC. L'implication du couple CD83m/CD83s dans l'activité d'autres maladies auto-immunes ou inflammatoires étant suggérés par les résultats de la littérature, son étude dans d'autres maladies bulleuses auto-immunes et l'effet de l'administration de CD83s à des modèles murins de MBAI pourrait présenter un intérêt majeur dans l'optique d'étayer les hypothèses émises par nos travaux.

Supplementary Data

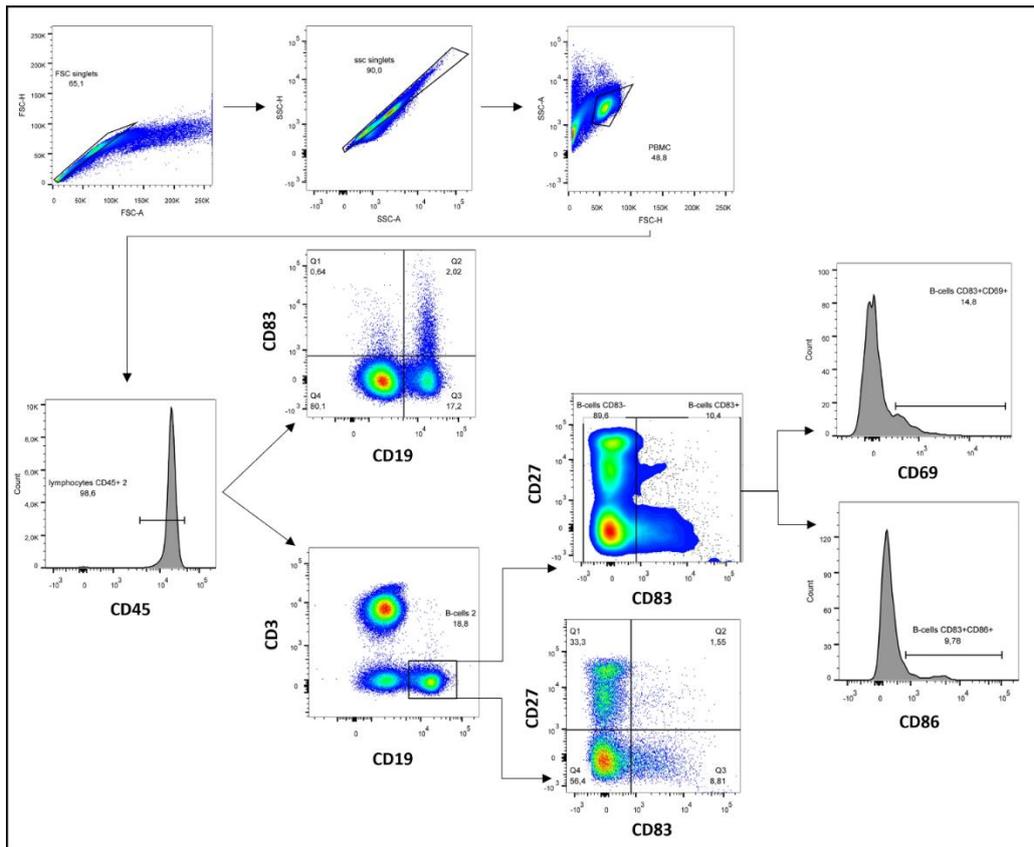


Supp Data 1: Résultats de l'analyse par RNA-seq comparant les transcriptomes des sous-populations de lymphocytes B de patients ayant un pemphigus et de donneurs sains appariés phénotypiquement. (A) Volcano plot montrant les résultats de l'analyse d'expression différentielle des gènes comparant les sous-populations. Les volcano plots montrent les gènes significativement ($FDR < 0.05$) surexprimés (\log_2 Foldchange > 1) et sous-exprimés (\log_2 Foldchange < -1), par leur coloration rouge ou bleue respectivement. (B) Modules transcriptionnels enrichis dans les listes de gènes différentiellement exprimés.

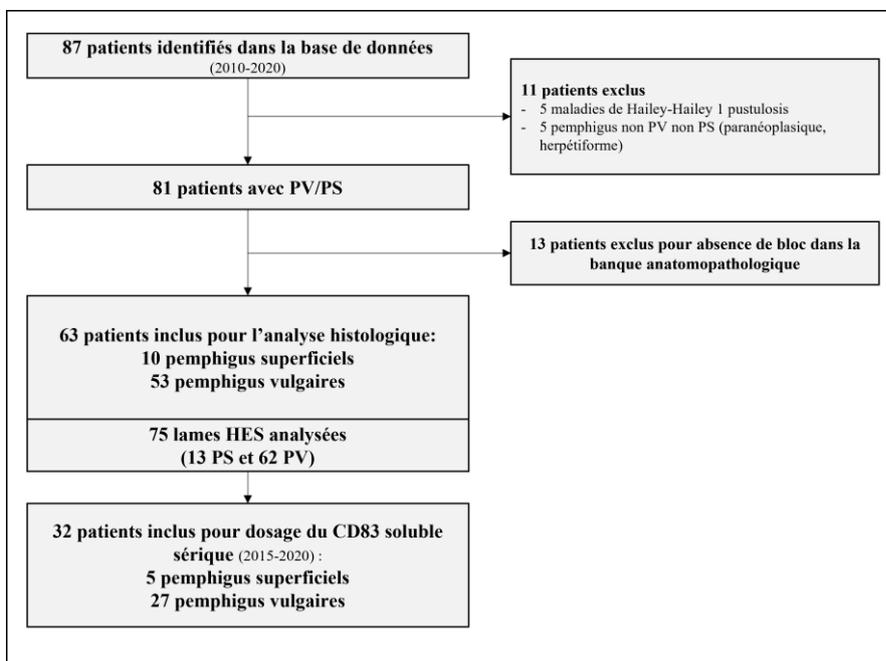


Supp Data 2: Résultats de l'analyse par single cell RNA-seq comparant les transcriptomes de lymphocytes B Dsg3⁺ et Dsg3⁻ de donneurs sains et de patient ayant un pemphigus au stade actif et au stade de rémission.

Volcano plot montrant les résultats de l'analyse d'expression différentielle des gènes comparant : (A) les lymphocytes B Dsg3⁺ de patients ayant un pemphigus en rémission (PV36) et de patients ayant un pemphigus actif (PVD0) ; (B) les lymphocytes B Dsg3⁻ de donneurs sains (HD) et de patients ayant un pemphigus actif (PVD0) ; (C) les lymphocytes B Dsg3⁻ de donneurs sains (HD) et de patients ayant un pemphigus actif (PVD0) ; (D) les lymphocytes B Dsg3⁻ patients ayant un pemphigus en rémission (PV36) et de patients ayant un pemphigus actif (PVD0). Les volcano plots montrent les gènes significativement (FDR<0.05) surexprimés (log2 Foldchange >1) et sous-exprimés (log2 Foldchange < -1).



Supp Data 3: Stratégie de fenêtrage de l'analyse par FACS des PBMC de patients et de donneurs sains.

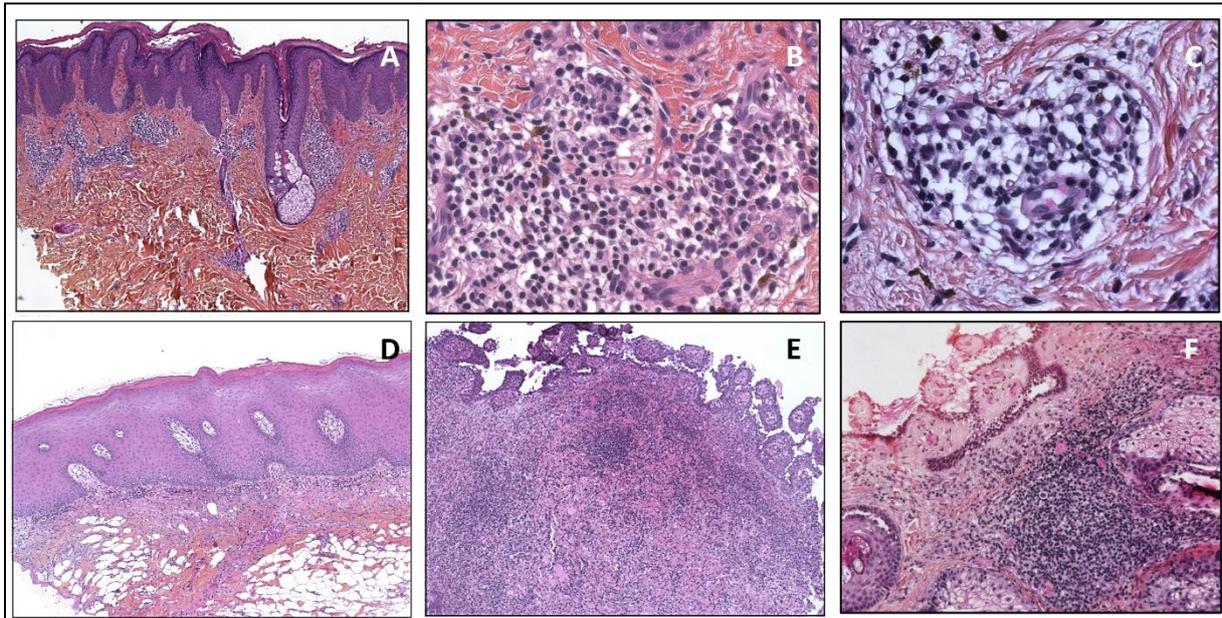


Supp Data 4: flow chart d'identification et des patients inclus pour l'analyse histologique et pour le dosage sérique du CD83 soluble.

Supp Data 5: Données cliniques des patients ayant un pemphigus inclus pour les analyses histologiques, immunohistochimiques, et du CD83 soluble sérique.

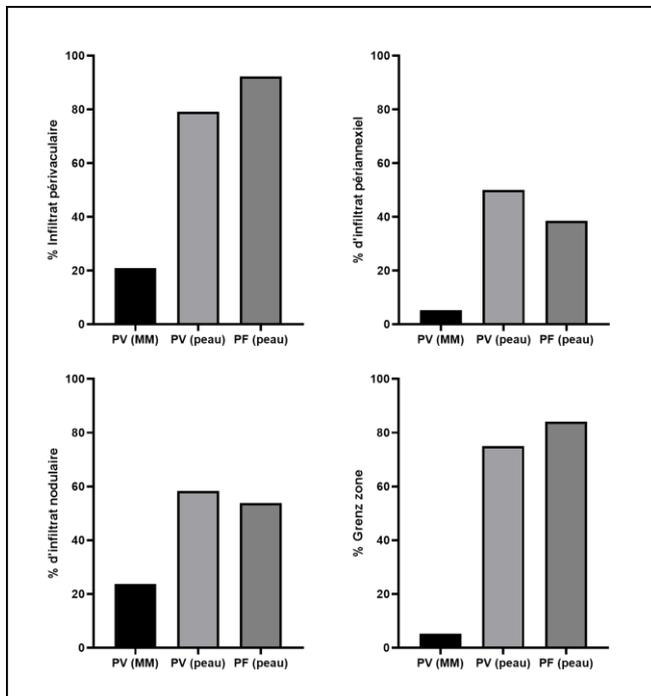
Patient	Sexe	Diagnostic	Age	Activité clinique	Temps (années entre biopsie et diagnostic)	Site de biopsie	Muqueuse biopsiée	Analyse IHC	ELISA CD83s	Thérapeutique après biopsie
1	M	PV	58	diagnostic	0	MM	lèvre		x	CS + RTX
2	M	PV	73	rechute	2	MM	joue	x		<i>nr</i>
3	F	PV	66	diagnostic	0	peau				<i>nr</i>
4	F	PS	65	diagnostic	0	peau			x	CS+RTX
5	F	PV	62	diagnostic	0	MM	joue			<i>nr</i>
6	M	PV	57	diagnostic	0	peau		x	x	CS + RTX
7	F	PV	33	rechute	6	peau			x	CS + RTX
8	F	PV	27	diagnostic	0	MM	joue			<i>nr</i>
9	F	PV	55	rechute	14	MM	joue		x	CS + RTX
10	F	PV	26	diagnostic	0	MM	gencive		x	CS
11	F	PS	37	rechute	4	peau		x		<i>Nr</i>
12	F	PV	42	diagnostic	0	peau				<i>Nr</i>
13	M	PV	54	diagnostic	0	peau				<i>Nr</i>
14	F	PV	43	diagnostic	0	MM	lèvre		x	CS
15	M	PV	61	rechute	19	peau			x	CS + RTX
16	F	PV	11	diagnostic	0	MM			x	CS
17	M	PV	49	rechute	2	peau et MM	gencive		x	CS + RTX
18	F	PV	68	diagnostic	0	MM	lèvre		x	CS + RTX
19	F	PV	24	diagnostic	0	MM	lèvre			<i>nr</i>
20	M	PS	75	diagnostic	0	peau			x	CS + RTX
21	F	PV	50	diagnostic	0	peau et MM	lèvre			<i>nr</i>
22	M	PV	38	rechute	9	peau		x	x	CS
23	F	PV	35	diagnostic	0	peau et MM	joue			<i>Nr</i>
24	M	PV	33	rechute	11	peau			x	CS + RTX
25	M	PV	51	diagnostic	0	MM	joue			<i>Nr</i>
26	F	PV	72	diagnostic	0	peau				<i>nr</i>
27	M	PV	51	rechute	10	MM	joue			<i>nr</i>
28	F	PV	71	diagnostic	0	peau			x	CS + RTX
29	F	PV	60	rechute	2	MM	lèvre		x	CS + RTX
30	F	PV	91	diagnostic	0	MM	lèvre		x	CS + RTX
31	F	PV	32	diagnostic	0	MM	lèvre		x	CS + RTX
32	F	PV	51	diagnostic	0	MM	lèvre	x		<i>nr</i>
33	M	PV	37	diagnostic	0	MM	gencive		x	CS
34	M	PS	35	rechute	2	peau				<i>Nr</i>
35	F	PS	24	rechute	5	peau				<i>Nr</i>
36	F	PV	44	diagnostic	0	MM	lèvre		x	CS + RTX
37	M	PV	14	rechute	4	MM	gencive			<i>Nr</i>

38	M	PV	27	diagnostic	0	MM	gencive			<i>Nr</i>
39	M	PS	55	diagnostic	0	peau		x		<i>nr</i>
40	F	PV	58	rechute	10	MM	lèvre		x	CS + RTX
41	F	PV	64	diagnostic	0	MM	lèvre			<i>nr</i>
42	M	PS	47	diagnostic	0	peau			x	CS+MMF
43	F	PS	51	diagnostic	0	peau		x	x	CS
44	F	PS	32	diagnostic	0	peau				<i>Nr</i>
45	F	PS	75	diagnostic	0	peau			x	CS
46	F	PV	41	diagnostic	0	peau et MM	joue		x	CS + RTX
47	M	PV	50	diagnostic	0	MM	no data	x		<i>Nr</i>
48	F	PV	65	diagnostic	0	peau				<i>Nr</i>
49	M	PV	41	diagnostic	0	MM	lèvre			<i>nr</i>
50	F	PV	36	diagnostic	0	peau			x	CS + RTX
51	M	PV	42	rechute	3	peau				<i>nr</i>
52	F	PV	83	diagnostic	0	MM	no data	x	x	CS+MMF
53	F	PV	55	diagnostic	0	MM	lèvre			<i>nr</i>
54	F	PV	49	diagnostic	0	MM	gencive	x		<i>nr</i>
55	F	PV	37	diagnostic	0	MM	joue		x	CS
56	F	PV	44	rechute	1	MM	gencive		x	CS+MMF
57	F	PV	35	diagnostic	0	MM	lèvre			<i>nr</i>
58	F	PV	50	diagnostic	0	MM	joue			<i>nr</i>
59	M	PV	65	diagnostic	0	MM	lèvre et gencive		x	CS
60	F	PV	72	diagnostic	0	peau				<i>nr</i>
61	M	PV	45	diagnostic	0	peau et MM	plancher buccal	x		<i>nr</i>
62	F	PV	30	diagnostic	0	peau				<i>nr</i>
63	F	PV	25	diagnostic	0	MM	lèvre		x	CS

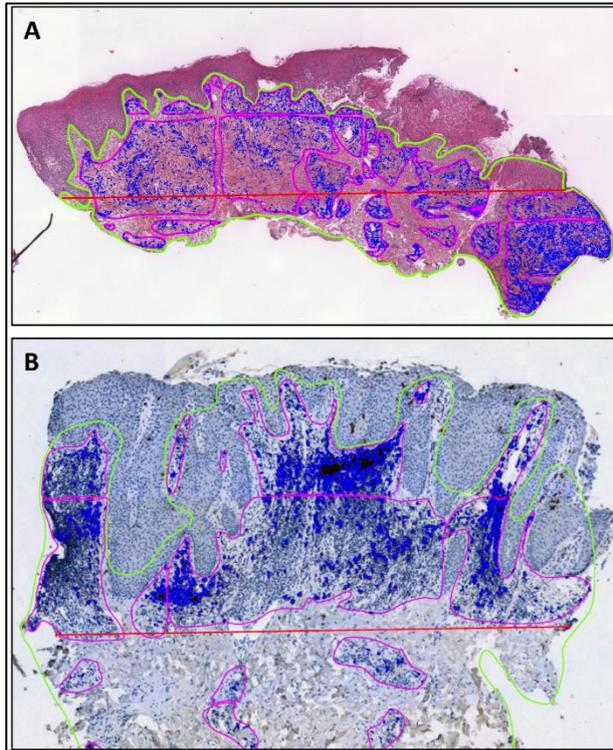


Supp Data 6. Exemples des infiltrats du derme et du chorion mis en évidence en peau lésée dans le pemphigus.

A. Infiltrat nodulaire périvasculaire et péri-annexiel avec grenz zone dans un pemphigus superficiel (HES x50) ; B. Infiltrat nodulaire périvasculaire grade II chez un pemphigus superficiel (HES, x200) ; C. Infiltrat grade I chez un pemphigus vulgaire (HES, x400) ; D. Infiltrat sous épidermique en bande avec grenz zone d'une muqueuse de pemphigus vulgaire (HES, x50) ; E. Infiltrat dense diffus d'une muqueuse de pemphigus vulgaire (HES, x50) ; F. Infiltrat nodulaire grade III d'une muqueuse de pemphigus vulgaire (HES, x100).

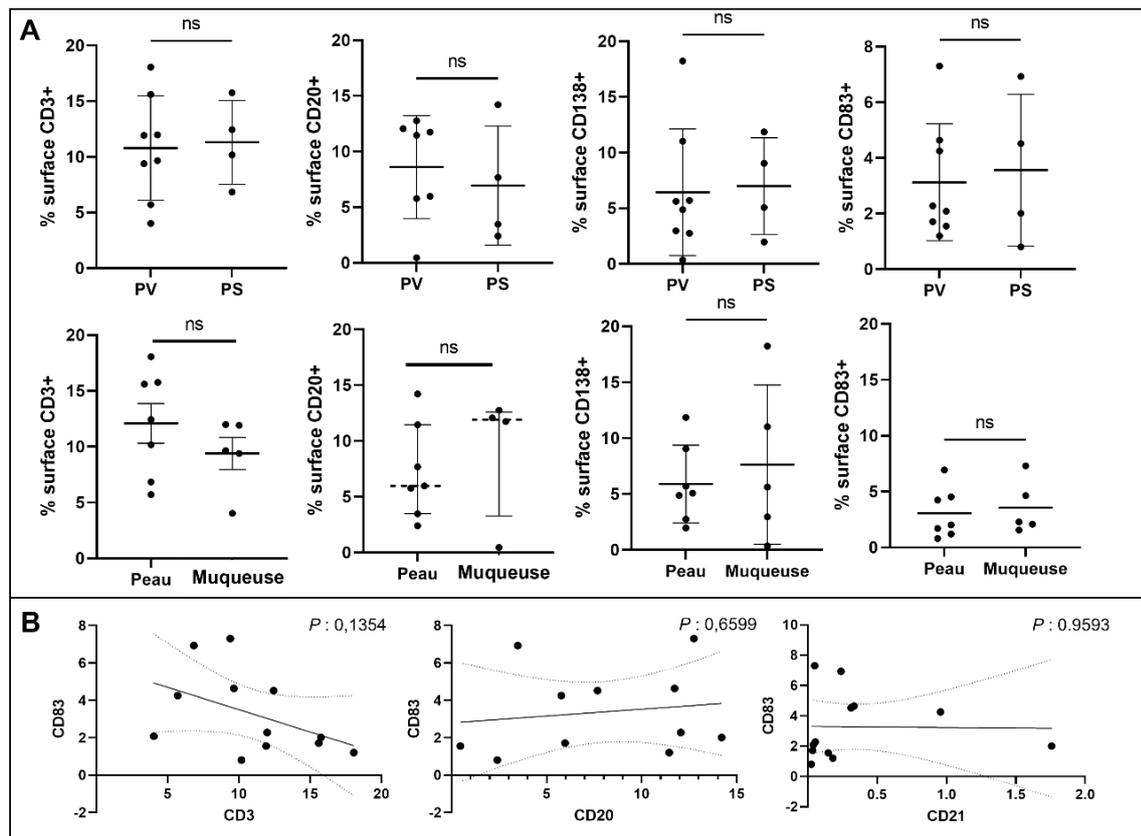


Supp Data 7 : Proportions des infiltrats présentant un renforcement périvasculaire, annexiel, un aspect nodulaire ou un aspect de grenz zone en fonction du type de pemphigus et du site biopsié.

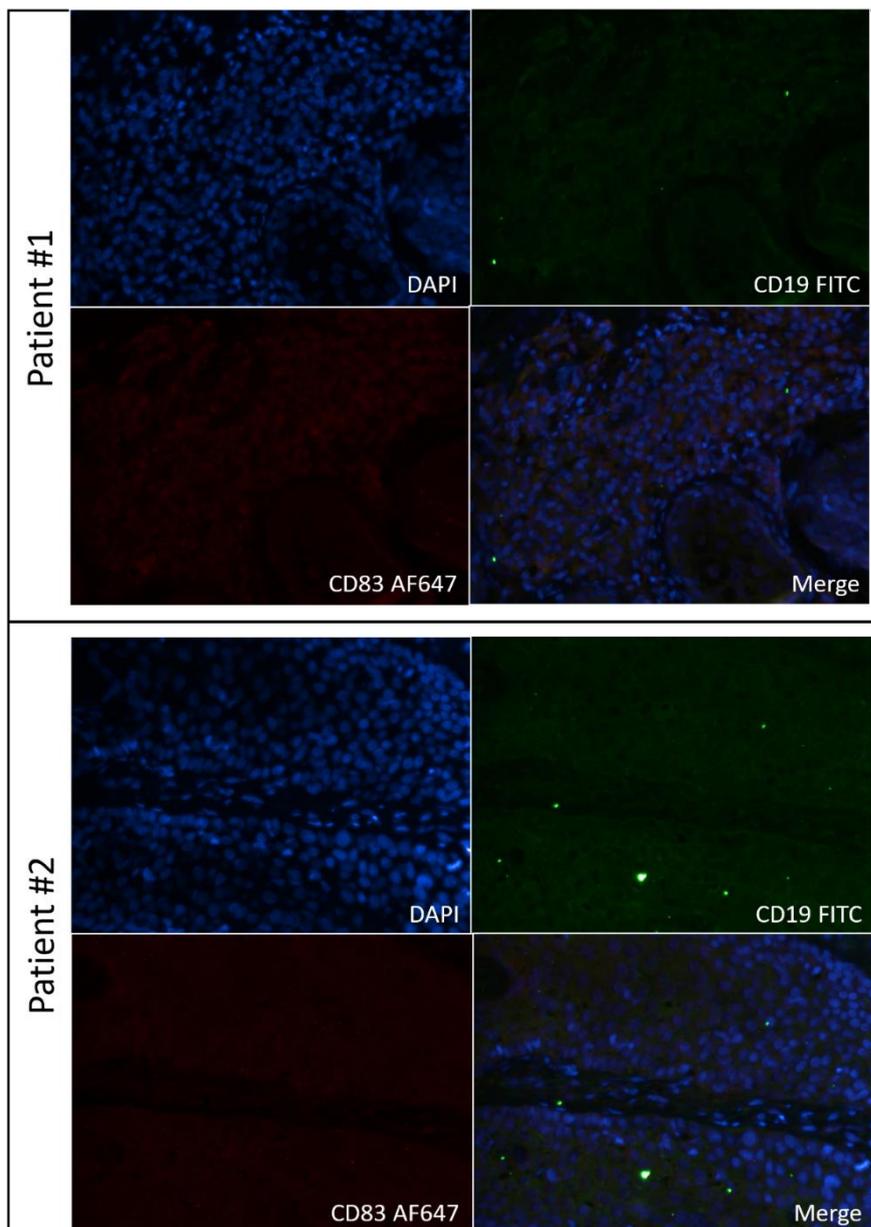


Supp Data 8 : Méthodes de mesure des densité d'infiltrat en HES et des surface marquée en immunohistochimie réalisée avec le logiciel Histolab®.

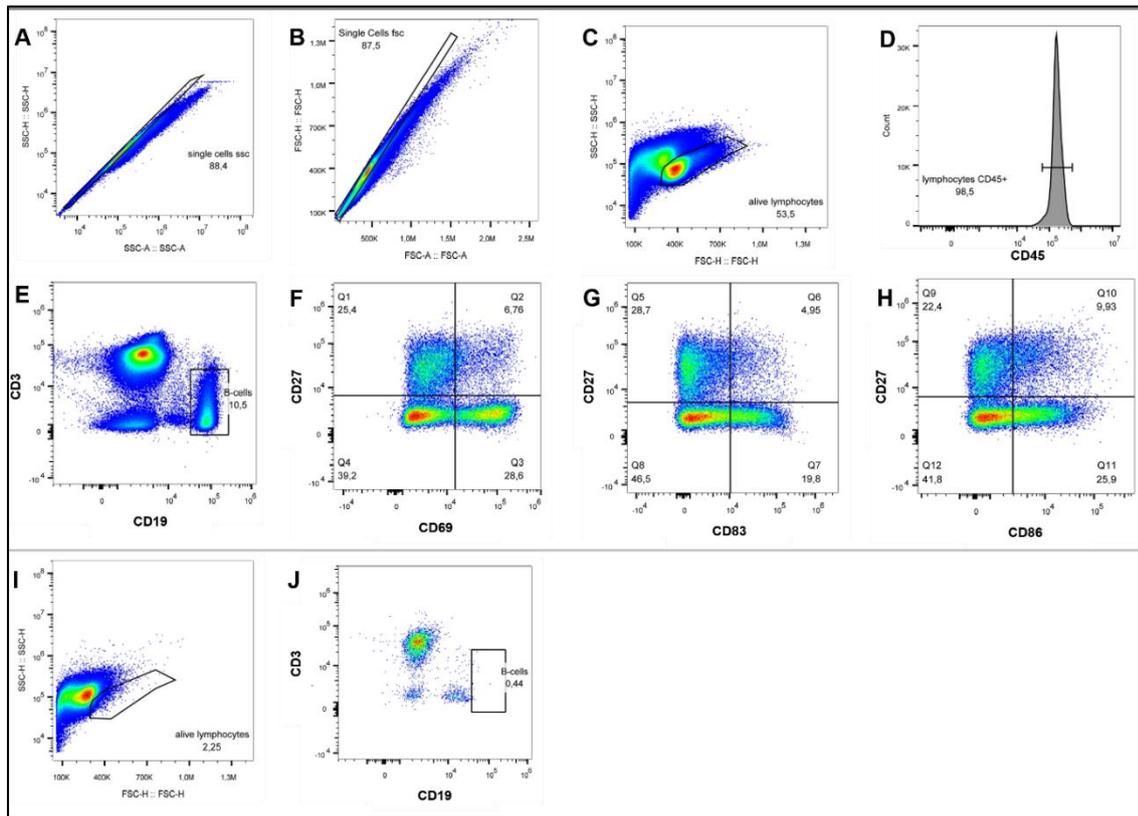
A. Mesure de l'infiltrat cellulaire sur coupe colorée à l'HES d'une biopsie en peau lésée de patient ayant un PV ; B. Mesure de la surface marquée par le CD20 sur une coupe d'une biopsie en peau lésée d'un patient ayant un PV étudiée en immunohistochimie. (Pour A et B, trait rouge : largeur du derme ; surface entourée en vert : surface du derme ; surface entourée en rose : surface infiltrée ; surface marquée en bleu : infiltrat cellulaire en HES (A) ou marqué par le CD20 (B))



Supp Data 9 A. Comparaison des surfaces marquées par CD3, CD20, CD138, CD83 en fonction du sous-type de pemphigus (PV/PS) et du site biopsié (peau/muqueuse) (médianes +/- IQR ; tests de Mann Whitney). B. Corrélation (Pearson) entre les surfaces marquées par le CD83 et par le CD3, le CD20 et le CD21.

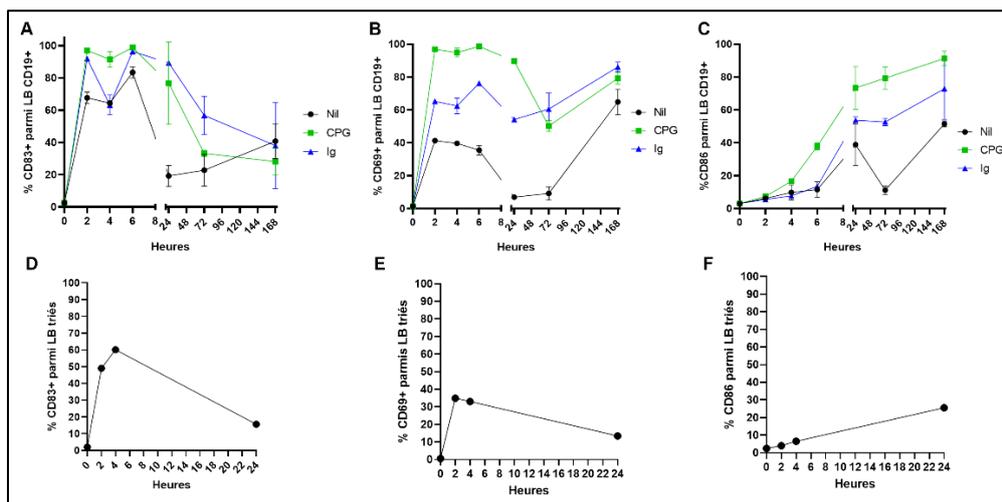


Supp Data 10. Co-immunofluorescence de CD19 et de CD83 au sein du derme en peau lésée de pemphigus. Résultats du co-marquage de 2 patients avec isotypes des anticorps FITC anti-CD18 et AF647 anti-CD83.



Supp data 11 : Stratégie de fenêtrage de l'analyse par FACS des PBMC de patients à J6 de culture.

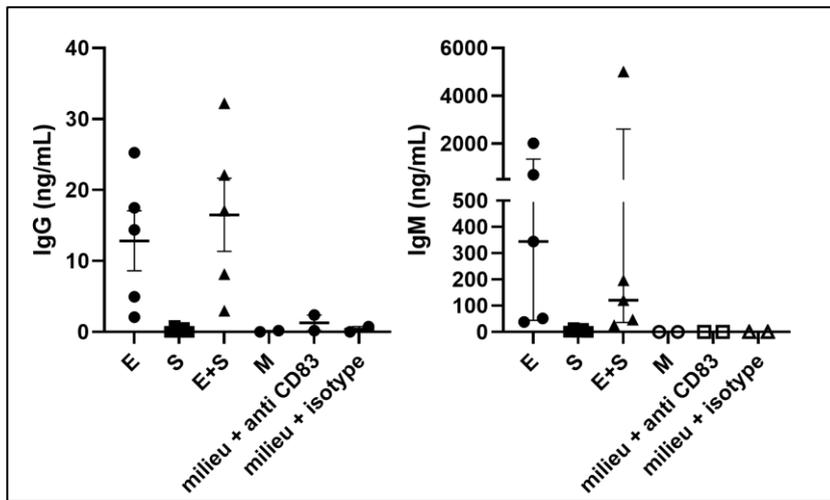
Les doublets ont été éliminé en SSC et FSC (A,B) ; une fenêtre a sélectionné les PBMC (C) puis les lymphocytes CD45+ ont été conservé (D) ; les lymphocytes B ont été sélectionnés sur un plot CD3 - CD19 (E), puis leur expression de CD69, CD83 et CD86 ont été évalués sur des plots (CD27 – CD69/CD83/CD86). Le fenêtrage permettait de ne pas considérer dans l'analyse les cellules stimulatrices irradiées qui persistait dans les conditions stimulées par allostimulation (I-J).



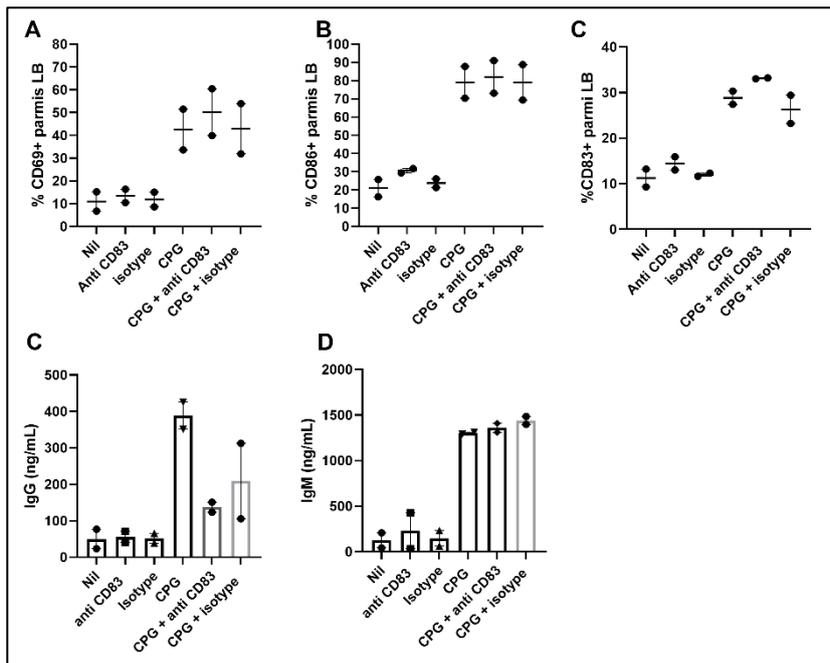
Supp Data 12 : Cinétiques d'expressions des marqueurs d'activation (CD83, CD69, CD86) par les lymphocytes B.

Cinétique d'expression de CD83 (A), de CD69 (B), de CD86 (C) par les lymphocytes B cultivés en PBMC en absence de stimulation (Nil), en présence de CPG ou d'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines humaines (Ig) (données provenant d'une expérience sur un donneur sain). Cinétique d'expression de CD83 (D), de CD69

(E), de CD86 (F) par les lymphocytes B cultivés seuls après tri négatif par billes magnétiques (données provenant d'une expérience sur un donneur sain).



Supp Data 13 : Taux d'IgG et d'IgM totales des conditions contrôles des expériences d'allostimulation de PBMC. Abréviations : E : PBMC de pemphigus ; S : pool de PBMC irradiées de 2 donneurs sains ; M : milieu de culture sans PBMC.



Supp Data 14 : Résultats de l'application d'anticorps anti CD83 polyclonal sur l'expression des marqueurs d'activation et la production d'immunoglobulines par les LB en culture de PBMC sans allostimulation.

Résultats d'une seule expérience menée sur PBMC d'un patients ayant un pemphigus actif, en absence de traitement (Nil), en présence d'anticorps polyclonal de lapin anti-CD83 humain (Anti-CD83), de gammaglobulines de lapin (Isotype) ou en présence de CPG (1 µg/mL). IgG et IgM totales des surnageants prélevés à J10 de

culture mesurées en ELISA (A, B). Expression à J6 de CD86 par les LB (C). CD83 soluble des surnageants prélevés à J1, JJ6 et J10 de culture mesuré en ELISA (D).

Annexes

Annexe I



Autoimmune Pemphigus: Latest Advances and Emerging Therapies

Yen Loo Lim¹, Gerome Bohelay², Sho Hanakawa³, Philippe Musette² and Baptiste Janela^{3,4,5,6*}

¹Department of Dermatology, National Skin Centre, Singapore, ²Department of Dermatology and INSERM U1125, Avicenne Hospital, Bobigny, France, ³A*STAR Skin Research Labs (ASRL), Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore, ⁴Skin Research Institute of Singapore (SRIS), Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore, ⁵A*STAR Infectious Diseases Labs, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore, ⁶Singapore Immunology network, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore

OPEN ACCESS

Edited by:

Ryan O'Shaughnessy,
Queen Mary University of London,
United Kingdom

Reviewed by:

Vani J.,
Indian Institute of Technology Madras,
India
Takashi Hashimoto,
Osaka City University, Japan

*Correspondence:

Baptiste Janela
Baptiste.Janela@asrl-a-star.edu.sg

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Biochemistry,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 03 November 2021

Accepted: 20 December 2021

Published: 04 February 2022

Citation:

Lim YL, Bohelay G, Hanakawa S,
Musette P and Janela B (2022)
Autoimmune Pemphigus: Latest
Advances and Emerging Therapies.
Front. Mol. Biosci. 8:808536.
doi: 10.3389/fmole.2021.808536

Pemphigus represents a group of rare and severe autoimmune intra-epidermal blistering diseases affecting the skin and mucous membranes. These painful and debilitating diseases are driven by the production of autoantibodies that are mainly directed against the desmosomal adhesion proteins, desmoglein 3 (Dsg3) and desmoglein 1 (Dsg1). The search to define underlying triggers for anti-Dsg-antibody production has revealed genetic, environmental, and possible vaccine-driven factors, but our knowledge of the processes underlying disease initiation and pathology remains incomplete. Recent studies point to an important role of T cells in supporting auto-antibody production; yet the involvement of the myeloid compartment remains unexplored. Clinical management of pemphigus is beginning to move away from broad-spectrum immunosuppression and towards B-cell-targeted therapies, which reduce many patients' symptoms but can have significant side effects. Here, we review the latest developments in our understanding of the predisposing factors/conditions of pemphigus, the underlying pathogenic mechanisms, and new and emerging therapies to treat these devastating diseases.

Keywords: pemphigus, pemphigus treatment, autoimmunity, autoimmune bullous diseases, advance in pemphigus

INTRODUCTION

Autoimmune bullous diseases (AIBDs) occur when self-reactive immune responses target the basement membrane or desmosomes of the skin and mucous membrane, leading to loss of epithelium integrity and varying severities of painful blistering (Schmidt et al., 2019). As a primary role of the skin is to protect from invading microorganisms, patients with bullous diseases can suffer recurrent, and potentially life-threatening infections, as well as chronic pain and lowered quality of life (Hsu et al., 2016). AIBDs are separated in two main subtypes, pemphigus and pemphigoid diseases. Pemphigus, from the Greek word "pemphix" (blister), is a heterogenous group of AIBDs affecting the stratified squamous epithelia, responsible for intraepithelial blistering, which is caused by inter-keratinocytic deposits of autoantibodies. Pemphigoid group in contrast affects the subepithelial layers of the skin and/or mucous membranes, responsible for subepithelial blistering, and thus exhibit distinct clinical features. In comparison with subepithelial AIBDs, most types of pemphigus do not involve the basement membrane. Among the pemphigus family are those more common variants, pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF), as well as the rarer paraneoplastic pemphigus (PNP), pemphigus herpetiformis (PH), and IgA pemphigus (Joly and Litrowski, 2011; Kasperkiewicz et al., 2017).

TABLE 1 | Types of pemphigus.

Clinical variant	General frequency	Ig subtype	Autoantigen	Clinical hallmarks
Pemphigus vulgaris	70 to 90%	IgG	Dsg3, Dsg1	Mainly oral mucosal lesions affecting the gingiva, palate, floor of the mouth, buccal mucosa, lips, tongue, nasal, pharyngeal, laryngo-oesophageal, urethral, genital (glans penis, vulva), perianal and conjunctival mucosae
Pemphigus foliaceus	10 to 30%	IgG	Dsg1	Flaccid and fragile blisters involving skin; no mucous lesions; erythroderma, puff pastry-like scales and crusts affecting sebaceous areas (scalp, face, presternal, interscapular skin)
Paraneoplastic pemphigus	5%	IgG	Dsg3, Dsg1, desmoplakin I and II, envoplakin, periplakin, plectin, BP230, BP180, A2ML1, Dsc1, epiplakin	Severe mucocutaneous lesions with erosions and ulcers involving tongue, lips and vermillion border, nasal, conjunctival and genital mucosa; skin involvement are polymorphic, with pustular, erythema multiform-like or lichenoid lesions; association with lymphoproliferative disorder, lymphoma, leukaemia, carcinomas, sarcomas
Pemphigus vegetans	1–2%	IgG	Dsg3, Dsg1, periplakin	Hypertrophic papillomatous vegetative skin lesions affecting intertriginous sites (axillae, inframammary folds, umbilicus, inguinal creases, anogenital skin, scalp, neck), flaccid blisters and erosions with fetid-odoured
IgA pemphigus	<2%	IgA	Dsg3, Dsg1, Dsc1	Annular erosive plaques, pustules affecting the skin of the trunk, proximal extremities, and intertriginous regions; uncommon mucosal involvement
Pemphigus herpetiformis	<2%	IgG	Dsg3, Dsg1, Dsc	Pruritic herpetiform blisters, annular urticarial plaques with or without erosions, scaly erosive patches mimicking eczema

Dsg, desmoglein; Dsc, desmocollin; BP230 or 180, bullous pemphigoid 230 or 180; A2ML1, α -2 microglobulin-like 1.

Although clinically and aetiologically distinct, all pemphigus variants induce the formation of flaccid blisters and erosions on the skin and/or mucous membranes, and are characterised histologically by acantholysis, in which keratinocytes separate from each other (Amagai et al., 1991). In this case, acantholysis is caused by autoimmune disruption of the desmosomes - specialised adhesive protein complexes that connect neighbouring keratinocytes to each other - as a result of the generation and deposition of IgG auto antibodies against the desmosomal structural proteins desmoglein (Dsg) 1 and/or Dsg3 (Amagai et al., 1991). While the main antigenic targets of these autoimmune skin conditions were discovered several decades ago, our understanding of the factors underpinning the initiation and progression of pemphigus remains incomplete. Moreover, despite recent advances in the treatment of pemphigus, many patients continue to suffer repeated relapses of their condition and/or treatment side-effects, and a significant proportion of cases remain refractory to currently available therapies. Pemphigus mortality rates is elevated compared to the general population (Kridin et al., 2017; Jelti et al., 2019).

In this review we will bring together recent progress in our understanding of the aetiology and pathogenic mechanisms of pemphigus and note those areas in which our knowledge remains incomplete. We will also discuss the latest advances and clinical trials aiming to offer better treatment of this challenging set of diseases and highlight key areas for future research and development.

THE PEMPHIGUS FAMILY OF AUTOIMMUNE SKIN DISEASES: CLINICAL FEATURES AND DIAGNOSIS

All patients with pemphigus variants exhibit autoantibodies against desmosomal structural proteins, but the discrimination of each variant is based on specificities in clinical presentation and/or histological features or in most commonly autoantibodies encountered (Hertl et al., 2015) (Table 1). Understanding the features that distinguish between variants and sub-variants is necessary to allow accurate and rapid diagnosis; moreover, it is hoped that, as we increased our understanding, variant-specific therapies will begin to emerge as part of personalised treatment strategies that take into account any comorbidities in this fragile patient population.

Pemphigus Vulgaris

Pemphigus vulgaris (PV) (*“vulgus”* which means “common” in Latin) accounts for up to 70% of pemphigus cases (Joly and Litrowski, 2011; Jelti et al., 2019) with an estimated incidence of between one and five cases per million inhabitants per year (Bastuji-Garin et al., 1995, 1996; Jelti et al., 2019). However, incidence varies greatly between different regions and ethnicities: while PV occurs at a rate of less than 0.76 per million population in Finland or less than 0.5 per million population in Germany (Hübner et al., 2016), its incidence is more than twenty times higher in the United States and Israel (Hammers and Stanley,

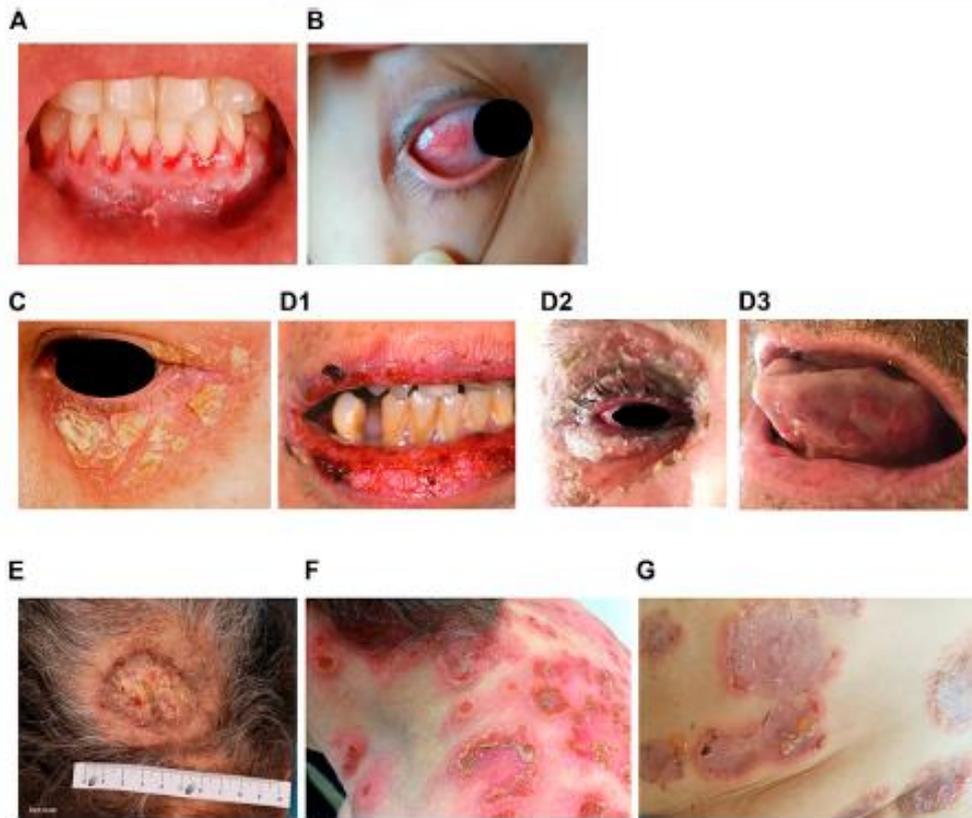


FIGURE 1 | Erosions of the alveolar gingiva and attached mucosa (A) and conjunctival involvement with episcleritis (B) in patients with pemphigus vulgaris. Puffy pasty-like scales and crusts on the periocular skin of a patient with pemphigus foliaceus (C). Severe stomatitis crusting and bleeding erosions on the lips that extended beyond the vermillion (D1), severe pseudomembranous conjunctivitis with mucus discharge and eyelid erosions (D2), diffuse lingual erosions (D3) in patient with paraneoplastic pemphigus. Vegetative plaque of pemphigus vegetans on the patient's occipital scalp (E). Post-pustular crusts with rounded or annular disposition in the trunk and neck in a patient with profuse IgA pemphigus (F). Trunk lesions with annular lesions in a pemphigus herpetiformis patient (G).

2016; Kridin, 2018). Regardless of the population, PV typically affects adults between the age of 45 and 65 years, with a slight female predominance (Joly and Litrowski, 2011; Didona et al., 2019). PV cases are extremely rare in children and its incidence increases with age (Kneisel and Hertl, 2011b). Almost all PV cases will develop oral mucosal lesions during the course of the disease; oral mucosal lesions being the first site involved in more 50–70% (Shamim et al., 2008; Pollmann et al., 2018) with lesions affecting the gingiva, palate, floor of the mouth, buccal mucosa, lips and tongue (Kneisel and Hertl, 2011a). Blistering in these sites can cause symptoms ranging from mild discomfort to such severe pain during eating that rapid weight loss ensues. Other mucous membranes may also be involved, including the nasal, pharyngeal, laryngo-oesophageal, urethral, genital (glans penis, vulva), perianal and conjunctival mucosae (Bystryn and Rudolph, 2005; Kneisel and Hertl, 2011a) (Figures 1A,B).

In muco-cutaneous variants, non-scarring skin lesions (flaccid blisters, crusts, erosions) arise during the course of the disease. Although any parts of the body can be affected, the predilection sites of PV lesions encompass face, neck, axillary folds, scalp and trunk, notably in seborrheic areas or exposed to mechanical

stress. Recent studies have also revealed other manifestations, such as nail involvement in patients with extensive disease (Pietkiewicz et al., 2018; De et al., 2019), and post-inflammatory hyperpigmentation that can last for months in patients with darker skin (Tamazian and Simpson, 2020). In case of cutaneous involvement, erosions can be induced in perilesional skin by applying tangential pressure, also known as Nikolsky's sign. The diagnosis of pemphigus is evoked upon clinical examination; histological analysis of a skin/mucous membrane biopsy taken in a lesional area and showing acantholysis is required to support the diagnosis. Direct immunofluorescence examination of biopsy samples taken in perilesional areas is considered the "gold standard" to confirm PV diagnosis, revealing intercellular deposits of IgG and/or C3 on the surface of keratinocytes in the epidermis or mucosa (Harman et al., 2017; Joly et al., 2020), but with the disadvantage of requiring invasive sampling. Additional immunological tests are carried out in parallel, including detection of autoantibodies in serum targeting the epithelial cell by indirect immunofluorescence (IIF) on monkey oesophagus or human skin, and by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to

detect circulating anti-desmoglein autoantibodies surface (anti-Dsg3 alone where there is mucosal involvement only, or anti-Dsg3 and anti-Dsg 1 in patients with mucocutaneous disease) (Joly et al., 2020). Of note, anti-Dsg ELISA is positive in 95% of cases and anti-Dsg values correlate with disease activity (Joly et al., 2020).

Pemphigus Foliaceus

Pemphigus foliaceus (PF) ("*folium*" meaning "leaf" in Latin) is the second most common type of pemphigus and accounts for 27% of cases in France (Gonçalves et al., 2011; Jelti et al., 2019). Unlike PV, PF overall affects a broader age range of individuals due to the varied age of onset of several PF sub-variants (Chapman et al., 2018). PF-associated acantholysis occurs within the subcorneal layer of the epidermis, leading to more flaccid and fragile blisters that involve the skin and spare the mucous membranes (Joly and Litrowski, 2011). PF blistering and erosions typically exhibit "puff pastry-like" scales and crusts which tend to affect the seborrheic areas on the body: the scalp, face, presternal and interscapular skin (Figure 1C). In severe forms, PF might present as an erythroderma (chronic erythema involving more than 90% of the body's surface area), in contrast with the large erosive areas found in PV. Subcorneal pustules or acantholytic clefts in the granular layer of the epidermis are distinguishing histological features of PF, which are important because both direct and indirect immunofluorescence findings are similar to those seen in PV. However, only anti-Dsg1 antibodies are present, accounting for the absence of mucosal lesions in PF (see Dsg 1/Dsg 3 compensation theory, below, and Mahoney et al. (1999)).

Several clinical sub-variants of PF which have been characterised have interesting and distinctive features. Notably, pemphigus erythematosus (PE) (also known as Senear-Usher syndrome) has a milder presentation with lesions often confined to or first seen in the malar area of the face in a butterfly shape, as typically found in lupus erythematosus (Amerian and Ahmed, 1985; Khachemoune et al., 2006; Hobbs et al., 2021). More extensive involvement might be seen in photo-distributed areas. Patients with PE also present with laboratory findings suggestive of systemic lupus erythematosus, including the presence of anti-nuclear antibodies in 30–80% of cases (Malik and Ahmed, 2007; Oktarina et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2012). It is not yet known how or whether these antibodies are related to the pathology seen in PE.

In addition to PE, three PF sub-variants restricted to particular locations or populations have been described. The first such "endemic" form to be described, in 1903, was fogo selvagem, which is found in subtropical areas of Brazil (Diaz et al., 1989; Aoki et al., 2015), where its prevalence can be as high as 3–5% of inhabitants (Gonçalves et al., 2011). While PF in children is generally rare (Kanwar and Kaur, 1991; Mintz and Morel, 2011), up to 30% of those affected by fogo selvagem are children or young adults (Diaz et al., 1989; Aoki et al., 2015). Colombian pemphigus foliaceus is a PF sub-variant that occurs within the El Bagre area of Northern Colombia (Abrèu-Velez et al., 2003a; Abrèu-Velez et al., 2003b), and closely resembles fogo selvagem, except for its male preponderance (Abrèu-Velez et al., 2003b).

The third endemic form is found in north African Arab countries, mostly in the southern area of Tunisia but also in Algeria and Morocco (Morini et al., 1993; Abida et al., 2009), and some sub-Saharan countries, such as Mali (Mahé et al., 1996). A predominance of cases among young women aged 25 to 34 years had been described in Tunisia (Bastuji-Garin et al., 1995, 1996) and familial cases have also been reported (Morini et al., 1993). The geographical restriction, the age and the more extensive lesions of these sub-variants pose intriguing questions on the aetiology of the disease, which in some cases has been partially resolved (see below).

Paraneoplastic Pemphigus

Paraneoplastic pemphigus (PNP) was first recognised in 1990 (Anhalt et al., 1990), and represents about 5% of pemphigus cases (Paolino et al., 2017). PNP is seen almost exclusively in patients with co-occurring neoplasms including lymphoproliferative disorders such as Castleman's disease and non-Hodgkin lymphoma, as well as thymoma, chronic lymphocytic leukaemia, and various carcinomas and sarcomas (Anhalt et al., 1990; Joly et al., 2000; Leger et al., 2012; Ohzono et al., 2015; Yatim et al., 2019). PNP predominantly affects patients between 45 and 70 years of age, but may also occur in children, particularly when associated with Castleman's disease (Wieczorek and Czernik, 2016). The condition typically presents as PV with severe mucocutaneous lesions, often with erosions and ulcers involving the tongue, and lesions on the lips that frequently extend to the vermilion border (Yatim et al., 2019). Other mucous membranes, such as nasal, conjunctival and genital mucosa, may also be involved (Yatim et al., 2019); alongside, PNP-suggestive features of skin involvement are polymorphic, with pustular, erythema multiform-like or lichenoid lesions in addition to the classical flaccid bullous form and typical erosions (Anhalt, 2004; Leger et al., 2012; Ohzono et al., 2015) (Figures 1D1–D3). PNP may also affect internal organs, particularly the lung, and, more rarely, the gastrointestinal mucosa (Odani et al., 2020). The severity of PNP, possibility of multi-organ involvement, and co-occurrence with underlying malignancy together combine to give a high mortality rate (Leger et al., 2012; Ohzono et al., 2015; Wieczorek and Czernik, 2016; Jelti et al., 2019).

Histologically, PNP is characterized by a "tombstone" appearance of acantholytic basal keratinocytes, associated with an interface or lichenoid dermatitis caused by self-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and with epidermal exocytosis and dyskeratotic or necrotic keratinocytes (Joly et al., 2020). Linear IgG/C3 deposits at the dermal-epidermal junction might also be present, in addition to positive intercellular labelling of the epithelium by DIF (Joly et al., 2020). Patients with PNP may develop IgG autoantibodies against a diverse array of antigens, including: Dsg3 (Amagai et al., 1998; Brandt et al., 2012), and several members of the plakin family (Mahoney et al., 1998) including the desmosomal plaque proteins desmoplakin I and II (Hashimoto et al., 1995), envoplakin (Kim et al., 1997), periplakin (Mahoney et al., 1998; Kazerounian et al., 2000), as well as against hemidesmosomal adhesion molecules such as plectin and bullous pemphigoid antigen (BP) 230 (also known as

dystonin-e), BP180 (also known as collagen α -1[XVII] chain) (Maier et al., 2017) and the proteinase inhibitor α 2-macroglobulin-like protein 1 (Schepens et al., 2010). In addition, approximately 75% of patients exhibit antibodies against desmocollins (Dsc) 1, 2 or 3 (Ishii et al., 2015; Ohzono et al., 2015). Anti-epiplakin antibodies are especially significant, both clinically and diagnostically as they are thought to be responsible for the occurrence of often-fatal bronchiolitis obliterans, which results from loss of adhesion of the lung epithelium (Tsuchisaka et al., 2016; Tsuchisaka et al., 2016). Considering these immunological features of PNP, IIF examination of the serum is usually performed using rat bladder to investigate reactivity against plakin proteins (Joly et al., 2000). ELISA for anti-Dsg and anti-envoplakin antibodies are usually made with immunoblots with epidermal extracts or extracts from cultured keratinocytes to investigate IgG reactivity against other antigens, especially anti-plakins (Probst et al., 2009; Joly et al., 2020). In the case of PNP, co-morbid malignancy is clear, and for some time the mechanism of association has been known. The emergence of PNP appears to be related to the generation of antibodies against tumour antigens which cross-react with epithelial antigens, including both desmosomal and hemi-desmosomal proteins. This process is similarly seen in the case of some environmental antigens (see below) in endemic PV, but similar “trigger antigens” have yet to be investigated or defined in other pemphigus variants.

Pemphigus Vegetans

Pemphigus vegetans, a rare clinical variant of PV which represents 1–2% of all pemphigus cases (von Köckritz et al., 2017). Due to its rarity, only few papers in the literature are specifically devoted to it with most of them are case reports (Mergler et al., 2017; Cuellar et al., 2020; Liu et al., 2020; Verma et al., 2020). Pemphigus vegetans is characterized by hypertrophic papillomatous vegetative skin lesions that preferentially affect intertriginous sites, such as the axillae, inframammary folds, umbilicus, inguinal creases, anogenital skin, scalp, and neck (Jain et al., 1989; Huang et al., 2005; Cozzani et al., 2007) (Figure 1E). Depending on the morphology of the initial lesions and the clinical course, pemphigus vegetans is further subdivided into two types: Neumann and Hallopeau. The Neumann type presents with flaccid blisters and erosions, evolving into fetid-odoured, whitish, macerated, hypertrophic, papillomatous plaques in the intertriginous body folds and lips, and more rarely on the trunk and extremities; the oral mucosa is usually involved (Leroy et al., 1982; Ahmed and Blose, 1984). By contrast, the Hallopeau type is associated with localised, pustular lesions that rupture and coalesce into vegetative erosions, and does not exhibit oral mucosa involvement (Zaraa et al., 2011; Imchen et al., 2014). Autoantibodies in pemphigus vegetans are against Dsg1 and Dsg3, as well as other proteins constituting the desmosome (Hashimoto et al., 1994; Cozzani et al., 2007).

IgA Pemphigus

IgA pemphigus, even rarer among the pemphigus family, is characterized clinically by annular erosive plaques rimmed by

pustules and affects the skin of the trunk, proximal extremities, and intertriginous regions (Figure 1F) (Geller et al., 2014). Mucosal involvement is uncommon (Kridin et al., 2020) and acantholysis is usually absent (Tsuruta et al., 2011). Here, IgA autoantibodies recognising various dermosomal proteins bind the epidermal cell surface and are detectable by direct immunofluorescence; while immune-serological assays are used to detect circulating IgA autoantibodies in these patients (Nishikawa et al., 1991; Geller et al., 2014). Depending on the level of pustule formation, IgA pemphigus can be divided into two major clinical and histological subtypes: intraepidermal neutrophilic dermatosis (IEN), which is characterized by suprabasilar pustules located at the lower or entire epidermis and associated with the presence of IgA antibodies against Dsg1 or Dsg3, and other yet-unidentified antigens; and subcorneal pustular dermatosis (SPD), in which patients exhibit subcorneal pustules in the upper epidermis and auto-reactive IgA binds desmocollin 1 (Dsc1) (Hashimoto et al., 1997; Karpati et al., 2000; Yasuda et al., 2000). IgA pemphigus may also be associated with IgA gammopathies, haematological disorders and ulcerative colitis (Hashimoto et al., 1997; Kridin et al., 2020).

Neonatal Pemphigus Vulgaris

Neonatal pemphigus vulgaris (NPV) is a transient immunobullous disease induced by transplacental transfer of maternal autoantibodies from a mother with PV to her newborn (Fenniche et al., 2006; Gushi et al., 2008; Turrentine et al., 2014; Carvalho et al., 2019; Fenner et al., 2020; Foster et al., 2021). First reported in 1975 (Salihbegović-Opalić et al., 1975; Zhao et al., 2016), few cases exist in the literature, as female patients with pemphigus can experience infertility, premature delivery and stillbirth (Ouahes et al., 1997). NPV has various clinical manifestations, including skin and mucosa defects, blisters and erosions at birth, and extensive skin exfoliation which can arise early after birth. As maternal-derived antibody levels drop, NPV resolves spontaneously or with mild topical corticosteroid treatment within 4 weeks of birth (Kardos et al., 2009). Importantly, before the development of the neonatal mouse model of PV, clinical observation of NPV gave the first evidence of the direct pathogenicity of pemphigus autoantibodies.

Pemphigus Herpetiformis

Pemphigus herpetiformis (PH), first named in 1975 (Jablonska et al., 1975), is a rare subtype of pemphigus. It clinically resembles to dermatitis herpetiformis, with patients exhibiting pruritic herpetiform blisters, and/or annular urticarial plaques with or without erosions, or scaly erosive patches mimicking eczema (Tay et al., 2018) (Figure 1G). However, immunological findings are consistent with pemphigus (Kasperkiewicz et al., 2014; Costa et al., 2019). Direct and indirect immunofluorescence demonstrate intercellular deposits of IgG and/or C3, with Dsg as the main target of autoantibodies, with additional recognition of Dsc (1,2,3) and other hemidesmosomal antigens, seen in some patients (Kozłowska et al., 2003; Ohata et al., 2013; Ueda et al., 2013; On et al., 2015). The histology of PH is less specific than that of PV and ranges from intraepidermal eosinophils or neutrophilic spongiosis (Hashimoto et al., 1983) to intraepidermal vesicles

filled with neutrophils or eosinophils, and may also encompass dermal papillary micro-abscesses (Costa et al., 2019).

THE PATHWAY TO PEMPHIGUS: RISK FACTORS FOR DEVELOPING THE DISEASE

Many autoimmune diseases have a complex aetiology, and pemphigus is no exception. Factors as diverse as genetics, environment, pre-existing health conditions, medication use and even post-vaccine reactions have been linked with the emergence of pemphigus. In this section we will review some of the most recent observations that are building up the picture of circumstances and pathways leading to the clinical manifestation of pemphigus.

Genetic Risk Factors

The familial clustering of certain variants of pemphigus, combined with its predilection for some ethnicities and co-occurrence of other autoimmune diseases in patients, all point towards a significant genetic component to susceptibility. To date, the strongest link has been reported for the association between PV and HLA class II genes (Gazit and Loewenthal, 2005; Tron et al., 2006; Vodo et al., 2018). Studies have shown that HLA alleles DRB1*04:02 and DQB1*05:03 represent the most common PV associated alleles (Ahmed et al., 1991; Carcassi et al., 1996; Delgado et al., 1996; Lee et al., 1998; Lombardi et al., 1999; Loiseau et al., 2000; Miyagawa et al., 2002; Geng et al., 2005; Liu et al., 2008; Shams et al., 2009; Tunca et al., 2010; Párnická et al., 2013; Brochado et al., 2016), with the majority of the patients with PV expressing one of these two alleles. While some of the HLA types are more population-specific, there are others that are associated with PV across numerous ethnic groups: a link between HLA-DRB1*04:02 and DQB1*03:02 with PV in the Jewish population has been highlighted (Gazit and Loewenthal, 2005), while HLA-DQB1*05:03 was found in association with PV in non-Jewish populations (Ahmed et al., 1991). Studies in Han Chinese patients with PV have highlighted DRB1*04, DRB1*14 and DQB1*05:03 as relevant risk alleles (Zhou et al., 2003; Geng et al., 2005; Liu et al., 2008; Gao et al., 2018), as well as HLA-DRB1*03 and HLA-CW*14 in the same Chinese population with PNP (Martel et al., 2003; Liu et al., 2008). Meta-analyses of the correlation between PV occurrence and HLA-DRB1 and HLA-DQB1 have shown that DRB1*04, DRB1*08, DRB1*14, DQB1*03:02 and DQB1*05:03 are significant susceptibility factors for PV while DRB1*03, DRB1*07, DRB1*15, DQB1*02, DQB1*03:03, DQB1*05:01 and DQB1*06:01 were less common in patients with PV compared to healthy individuals (Yan et al., 2012; Li et al., 2018). In addition to HLA class II alleles, there may be some association between PV and certain HLA class I alleles within specific ethnic groups, for example, HLA-A10 and -B15 in the Japanese population (Hashimoto et al., 1977; Miyagawa et al., 2002), and HLA-A3, -A26, and -B60 in the Han Chinese population (Gao et al., 2018). However, although numerous studies have suggested that HLA status could be a key driver of pemphigus disease activity, the mechanistic link between the

HLA genetic profile and the clinical picture within patients remains unclear.

Alongside the HLA susceptibility studies, other research has uncovered associations between PV and autoantigen or immune gene sequences: specific *Dsg3* haplotypes were significantly linked with PV in both British and Indian cohorts (Capon et al., 2006); while single nucleotide polymorphisms within the variable region of the immunoglobulin heavy chain *VH3* gene were associated with PV in two patients (Yamagami et al., 2009). Genetic variants of the cytokine genes *TNF- α* , *IL-6* and *IL-10* gene have also been linked with PV (Torzecka et al., 2003; Pereira et al., 2004; Eberhard et al., 2005; Mosaad et al., 2012; Toumi et al., 2013; Dar et al., 2016; Vodo et al., 2016); as have those affecting the *TAP2* gene, which encodes a protein involved in peptide assembly and transport to HLA class I (Niizeki et al., 2004; Slomov et al., 2005). Immune-associated SNPs that have been linked with pemphigus include those within the *ST18* gene, which encodes a transcription factor involved in inflammation and apoptosis (Sarig et al., 2012; Vodo et al., 2016; Etesami et al., 2018; De Bonis et al., 2019; Radeva et al., 2019; Assaf et al., 2021); and those within the *CTLA4* and *CD86* genes, whose protein products are expressed on antigen-presenting cells (APC) and are involved in activating T-cells and stimulating IgG production by B cells (Dalla-Costa et al., 2010; Tanasilovic et al., 2017).

While strong linkages have been found to exist between pemphigus and some of the above HLAs, the vast majority of individuals who carry the PV-associated HLA susceptibility alleles do not develop the disease. This prompted a group of researchers to discover a subset of PV-related differentially expressed genes which suggests a “protection” signature in genetically susceptible individuals from developing PV (Dey-Rao et al., 2013).

Knowing the genetic susceptibility in pemphigus may spur further research to better understand the interactions between various genetic susceptibility factors, the role of epigenetics and the functional effects of the identified genetic variants in disease-relevant cells, and hopefully, ultimately, their influence on response to treatment and severity of disease (Petzl-Erler, 2020).

Environmental Risk Factors

The lived-in environment is a complex mixture of factors that act across time and space, interacting with genetic susceptibility to affect health outcomes. Studying this intricate web of influences has led to the identification of significant factors linked with the development of pemphigus in specific populations.

In the case of endemic pemphigus foliaceus in Brazil, the observation that many of the adults affected by fogo selvagem were outdoor workers living in conditions of poor hygiene and low-quality housing, built in forest areas adjacent to rivers and streams (Diaz et al., 1989; Aoki et al., 2015), led researchers to seek environmental factors causing the disease. These investigations resulted in the identification of sand flies as a triggering factor the salivary protein LJM11 of *Lutzomyia longipalpis* (also known as black fly) (Culton et al., 2008) cross reacts with *Dsg1* (Warren et al., 2000; Qian et al., 2012).

Ultraviolet radiation has been reported to exacerbate or cause new-onset of pemphigus (Fryer and Lebwohl, 1994; Muramatsu

et al., 1996; Aghassi, 1998; Kano et al., 2000; Makino et al., 2014). A study using medical records review showed that the majority of pemphigus patients had the first manifestation of their disease in spring and summer of Sofia, Bulgaria (Tsankov et al., 2000). Hospitalisation primarily for pemphigus was also noted to be higher in days with higher UV index for Hispanic pemphigus patients in United States (Ren et al., 2019). In a more recent study which looked at seasonal patterns and triggering factors in non-endemic pemphigus foliaceus in Turkey (Sayar and Küçükoglu, 2021), it was also observed that new onset and relapses of non-endemic pemphigus foliaceus occurred more often during the spring-summer season where UV radiation is at its peak, further supporting the possible role of UV radiation as a trigger factor in this disease. While it has been demonstrated that UVB induces acantholysis and epidermal intercellular deposition of immunoreactants in Fogo selvagem patients (Reis et al., 2000), the molecular pathway still needs to be fully elucidated.

Other environmental risk factors for the development of pemphigus include trauma (Daneshpazhooh et al., 2016), stress (Cremniter et al., 1998; Morell-Dubois et al., 2008), diet (Ruocco et al., 2001). Interestingly, smoking seems to confer a protective effect on pemphigus (Valikhani et al., 2007). Cigarette smoking has also been found to improve pemphigus disease and those who smoked had earlier disease remission (Valikhani et al., 2008). It is postulated that interaction of nicotine and other nicotinic agonists with nicotinic acetylcholine receptors on keratinocytes may promote cell-cell adherence (Grando and Dahl, 2000).

Therapeutic Risk Factors

Drugs have been reported to trigger pemphigus. The three main groups of drugs which has been reported to be associated with new onset or exacerbation of pemphigus are the thiol drugs, phenol drugs and non-thiol/non-phenol drugs. Thiol drugs have sulfhydryl (-SH) group in their chemical structure and are probably the better studied group of drugs in the pathogenesis of pemphigus. In a systematic review of 170 drug-induced pemphigus (Ghaedi et al., 2021), penicillamine, captopril and bucillamine, which belong to the thiol drugs, were the most commonly reported drugs to induce pemphigus.

Biological thiol substances such as cysteine and glutathione has been shown to induce acantholysis in human skin fragments under certain experimental conditions (Ruocco et al., 1982). *In vitro* experiments subsequently demonstrated that thiol drugs (D-penicillamine, captopril, thiopronine and piroxicam) induce acantholytic splitting in human skin fragments or skin cultures in the absence of pemphigus antibodies (i.e. biochemical acantholysis) (Ruocco et al., 1993). It is postulated that thiol drugs form drug-cysteine disulfides which directly interfere with desmoglein adhesions between keratinocytes, or indirectly through antigen modification and autoantibodies production (Wolf and Ruocco, 1997). Plasminogen activator inhibitor, a proteolytic enzyme, has been shown to be important in preventing immunoglobulin-induced acantholysis in pemphigus (Hashimoto et al., 1989). Thiol drugs, on the other hand, stimulate plasminogen activator through inhibition of their natural inhibitors, leading to promotion of acantholysis (Hashimoto et al., 1984; Lombardi et al., 1993).

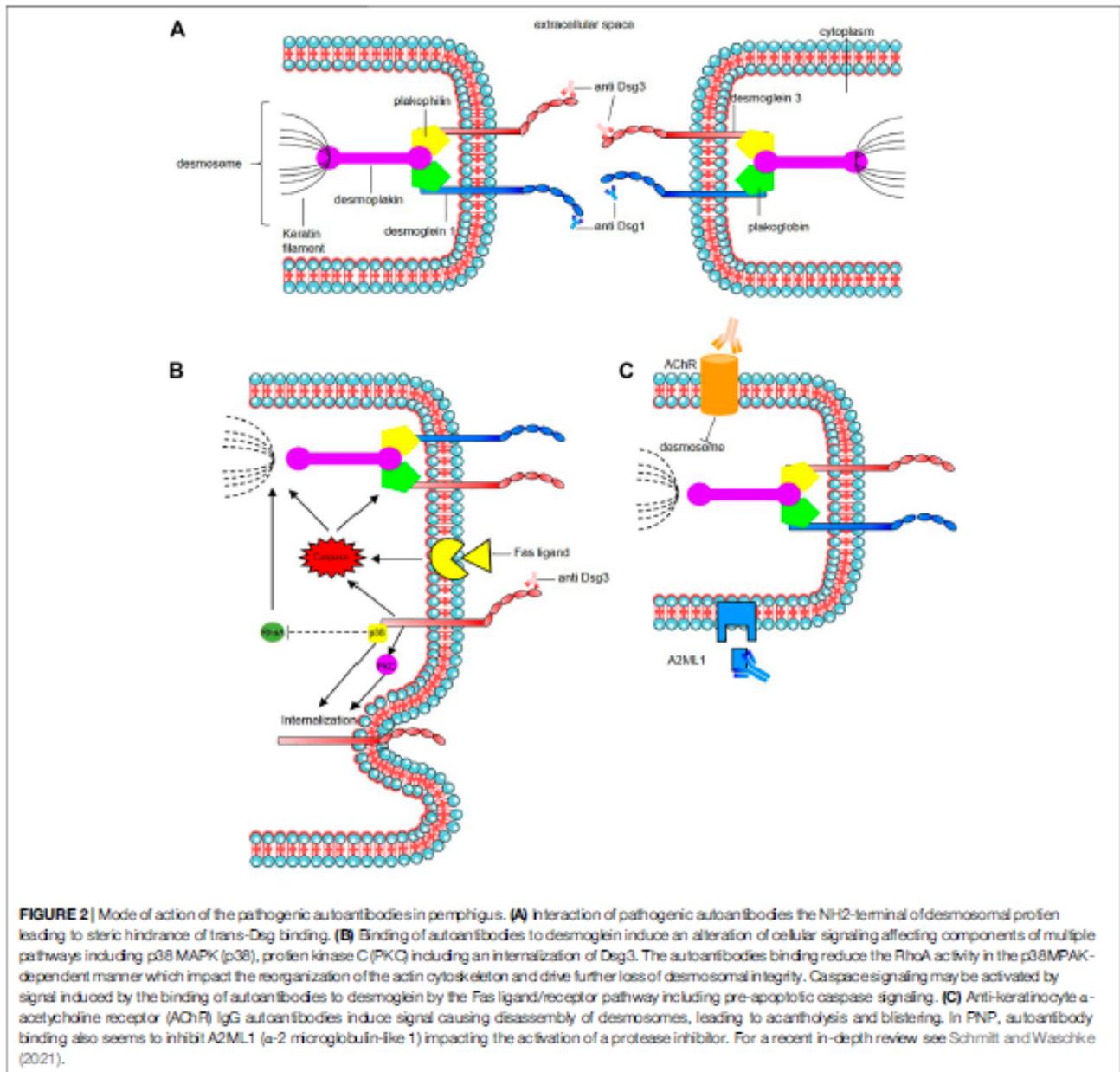
Other than drugs, vaccines have also been reported to trigger or exacerbate pemphigus. Amongst them are influenza (Mignogna et al., 2000; De Simone et al., 2008), hepatitis B (Berkun et al., 2005), rabies (Yalçın and Alli, 2007), tetanus (Cozzani et al., 2002) and more recently, SARS-COV2 vaccines (Damiani et al., 2021; Koutlas et al., 2021; Lua et al., 2021; Solimani et al., 2021; Thongprasom et al., 2021). While the mechanisms behind vaccine-induced pemphigus has not been worked out, there are several hypotheses other than those proposed for drug-induced pemphigus. These include autoimmunity arising from molecular mimicry of vaccines or their adjuvants with self-antigens (Shoenfeld et al., 2000), and non-specific activation of innate immunity and expansion of autoreactive T cells (Horwitz and Sarvetnick, 1999). It is however interesting to note that infections which these vaccines are used against, have not been reported as triggers for pemphigus (Brenner et al., 2002).

AUTOIMMUNE PATHWAYS AND PROCESSES IN PEMPHIGUS

Autoantibodies

Following the identification of Dsg 1 and 3 as critical pemphigus autoantigens (Eyre and Stanley, 1987, 1988; Hashimoto et al., 1990; Amagai et al., 1991; Mahoney et al., 1999; Amagai and Stanley, 2012), many studies have investigated the autoantibodies and autoreactive B cells that drive pemphigus pathogenesis. The extracellular domains, EC1 and EC2, of Dsg have been defined as the main target region recognised by autoantibodies from pemphigus patients (Amagai et al., 1992, 1995; Futei et al., 2000; Sekiguchi et al., 2001; Payne et al., 2005; Ishii et al., 2008; Chan et al., 2010; Di Zeno et al., 2012), with some evidence of minor EC4 recognition, and IgG4 is now known to be the major pathogenic antibody isotype (Dmochowski et al., 1992; Allen et al., 1993; Wilson et al., 1993). However, other isotypes may also be pathogenic in some variants or circumstances (Payne et al., 2005; Saleh et al., 2015). Interesting new data have revealed that DSG3-specific memory B cells have an activated phenotype and show signs of ongoing affinity maturation and clonal selection (Cho et al., 2019).

Although Dsg-specific autoantibody titre was long-thought to correlate with disease activity in pemphigus (Amagai et al., 1999; Daneshpazhooh et al., 2007; Abasq et al., 2009; Schmidt et al., 2010), more recent studies have detected anti-Dsg3 IgG antibodies in patients who were in clinical remission, suggesting the existence of non-pathogenic Dsg-specific IgG (Belloni-Fortina et al., 2009; Yoshida et al., 2017; Chernyavsky et al., 2019). This concept of pathogenicity has been confirmed by *in vivo* and *in vitro* studies demonstrating that pathogenic IgG autoantibodies preferentially target the NH₂-terminal portion of Dsg3. Non-pathogenic autoantibodies recognize epitopes of the membrane proximal COOH-terminus of the Dsg ectodomains (Amagai et al., 1992; Futei et al., 2000; Bhol and Razzaque Ahmed, 2002; Tsunoda et al., 2003; Chan et al., 2010; Lo et al., 2016). Comparing conventional and EDTA-pretreated anti-Dsg3 commercial ELISA, Kamiya et al. demonstrated the presence



of anti-Dsg antibodies directed against calcium-dependent epitopes targeting the extracellular domains of Dsg3 (Kamiya et al., 2012) and found a higher correlation between antibodies against calcium-dependent epitopes of Dsg3 and clinical activity than with total anti-Dsg3 antibodies (Kamiya et al., 2013). The pathogenic activity of these IgG directed against Ca-dependent epitope is sustained by their ability to induce the keratinocyte dissociation *in vivo* (Kamiya et al., 2012).

In PF and PV subtypes, Dsg1 and Dsg3 specific antibodies might directly affect the clinical presentation due to their differential expression in skin and mucous membranes. While patients with PV often experience mucosal and cutaneous

blistering, and possess both anti-Dsg1 and anti-Dsg3 antibodies, those with PF have antibodies only to Dsg1 and present with cutaneous but not mucosal involvement. Dsg1 is mainly expressed in the upper epidermis and upper layers of the mucosa, while Dsg3 is predominantly expressed in the suprabasal layers of the epidermis and throughout the mucosal epithelium. This differential expression of Dsg1 and Dsg3 in the epidermis and mucosa together with the postulation that the Dsg can compensate for each other's adhesive function when expressed on the same keratinocyte: this is the Dsg1/Dsg3 compensation theory (Amagai, 2009; Amagai and Stanley, 2012). Unfortunately, this concept cannot explain all clinical forms of pemphigus,

especially those with atypical features, and the factors affecting the ability or extent of functional compensation have yet to be revealed. With better immunological profiling of pemphigus, a modification of the compensation theory and new alternative pathogenic mechanisms need to be evaluated (Koga et al., 2012; Sardana et al., 2013; Carew and Wagner, 2014; Ahmed et al., 2016; Öktem et al., 2018).

The mode of action of the pathogenic autoantibodies found in pemphigus patients is now also well-defined (Figure 2). The desmosomal depletion that leads to acantholysis can be divided into two major mechanisms: firstly, the interaction of IgG autoantibodies with the NH₂-terminal EC1 subdomains of Dsg1 and Dsg3 in PF and PV, respectively, leads to steric hindrance of trans-Dsg binding (Heupel et al., 2008; Jennings et al., 2011; Saito et al., 2012), and also disrupts the interaction between Dsg and flotillin (Völlner et al., 2016), together leading to the loss of desmosomal integrity (Figure 2A). The second mechanism is an alteration to cellular signalling that is induced by autoantibody binding affecting components of multiple pathways including p38 MAPK, protein kinase C (PKC), c-Jun N-terminal kinases (JNK), RhoA and caspases 3, 6, 8 and 9, which leads to Dsg endocytosis and depletion driving further loss of desmosomal integrity and adhesion (Puviani et al., 2003; Berkowitz et al., 2005, 2006, 2008; Frušić-Zlotkin et al., 2005; Kawasaki et al., 2006; Lee et al., 2009; Cirillo et al., 2010; Mao et al., 2011) (Figure 2B). In PNP, autoantibody binding also seems to inhibit A2ML1 (α -2 microglobulin-like 1) impacting the activation of a protease inhibitor (Inaoki et al., 2001; Schepens et al., 2010; Numata et al., 2013) (Figure 2C). For a recent in-depth review of this topic see (Schmitt and Waschke, 2021).

In addition to anti-Dsg IgG autoantibodies, various antibodies targeting other autoantigens have been identified, notably with proteomics studies (Kalantari-Dehaghi et al., 2013), in the sera of a minority of patients with various forms of pemphigus with an unclear pathogenic role (Nguyen et al., 2000b; Ahmed et al., 2016; Amber et al., 2018). IgG and IgA autoantibodies against desmocollins (Dsc1, Dsc2 and Dsc3 being Ca²⁺-dependent cadherins involved in desmosome assembly) have been detected in variable percentage of pemphigus patients (5–60%), according cohorts, Dsc subfamily and the type of pemphigus variant (Dmochowski et al., 1993; Müller et al., 2009; Ishii et al., 2015; Mindorf et al., 2017). Their rates are higher in rare variants such as IgA pemphigus, PNP, and pemphigus herpetiformis (Hashimoto et al., 1997; Müller et al., 2009; Ishii et al., 2015; Mindorf et al., 2017). It has been demonstrated that anti-Dsc3 react against extra cellular domains of Dsc3 in human skin model resulting in intraepidermal blister formation, and in loss of intercellular cohesion in keratinocyte culture induced by targeting of the Dsc3/Dsg1 binding on keratinocyte cell surface as Dsc and Dsg are interacting by homophilic and heterophilic trans-interaction (Spindler et al., 2009). Anti-keratinocyte α -acetylcholine receptor (AChR) IgG autoantibodies have been also reported in 85% of PV and PF patients (Nguyen et al., 1998; Lakshmi et al., 2017). Inhibition of these receptors which control keratinocyte adhesion and motility may induce signals causing disassembly of desmosomes, leading to acantholysis and blistering (Figure 2C). Autoantibodies

against muscarinic AChRs but also against mitochondrial nAChR were found (Chernyavsky et al., 2015). A correlation of anti-muscarinic AChRs antibody titers and anti-Dsg antibody titers with the severity of disease in patients with pemphigus has been reported (Lakshmi et al., 2017). The role of these autoantibodies found in sera from pemphigus is unclear, as the fact that they could result from epitope spreading following the loss of tolerance or have a synergistic action with anti-Dsg in pemphigus pathogenesis (Nguyen et al., 2000a; Grando, 2000). Some react mainly against structural components of adhesion molecules such as desmosomes like autoantibodies against desmoplakin 1, desmoplakin 2 (Kim et al., 2001), Dsg4 (Kljuic et al., 2003; Nagasaka et al., 2004), E-cadherin (Evangelista et al., 2008; Oliveira et al., 2013), plakoglobin (Korman et al., 1989; Ishii et al., 2001), plakophilin 3 (Lambert et al., 2010), FC ϵ R1 (Fiebiger et al., 1998), and pemphaxin (Nguyen et al., 2000a) while other impact protease inhibitors such as anti-A2ML1 or anti-HSPCA1 (Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase encoded by ATP2C1 gene) which is involved in Golgi apparatus trafficking and of which impairment could lead to the impairment of proteic assembly and adhesion to the membrane as in hailey-hailey disease (Kalantari-Dehaghi et al., 2013). Although mouse models have been designed to incorporate some of these autoantibodies (Chen et al., 2008; Rafei et al., 2011), their role in pemphigus pathogenesis is still unclear (Spindler et al., 2018) and more complex mouse model need to be designed.

T Cells

While autoantibodies produced by B cells are the key and direct pathogenic mediators of pemphigus, recent studies are beginning to illuminate the broader autoimmune picture, with an emphasis on the role of T cell subsets. The disruption of peripheral T cell-mediated tolerance to self-antigens can be a critical event leading to autoantibody generation, inflammation, and tissue infiltration by immune cells: thus, a role for autoreactive helper T cells in driving pemphigus has long been postulated. Patients with pemphigus possess Dsg3-reactive Th1 and Th2 cells (Lin et al., 1997; Rizzo et al., 2005), with some studies finding comparable frequencies of the two subsets (Eming et al., 2000), and others detecting greater numbers of autoreactive Th1 compared to Th2 cells (Veldman et al., 2003). Studies in a humanized HLA-DRB1*04:02 transgenic mouse model showed that T-lymphocytes recognize human desmoglein 3 epitopes in the context of HLA-DRB1*04:02 (Eming et al., 2014). This recognition was associated with a CD40-CD40L-dependent T-cell–B-cell interaction that lead to the induction of pathogenic IgG autoantibodies, which in turn triggered intraepidermal blister formation. Although it seems likely that both Dsg3-reactive Th1 and Th2 cell are important for pemphigus development, most studies have focused on the role of Th2 cells and shown them be critical for the development of the disease. Frequencies of Dsg3-reactive Th2 cells are significantly higher in patients than controls, and their levels are positively correlated with disease activity (Rizzo et al., 2005). In addition to Th2 cells, Th2 cytokine levels are significantly higher in the serum of patients with PV than

controls, suggesting an imbalance between Dsg3-reactive Th2 and Th1 cells in the pathogenesis of PV (Satyam et al., 2009; Lee et al., 2017). However, the role of other T cell subsets in pemphigus pathogenesis remained unclear.

Th17 cells are identified by their specific expression of the transcription factor ROR γ t and have been implicated in the autoimmune pathology of a range of conditions including psoriasis (Fitch et al., 2007), ankylosing spondylitis (Taams et al., 2018) and, more recently, pemphigus (Xu et al., 2013; Timoteo et al., 2017; Jmaa et al., 2018). In patients with PV, the frequency of Th17 cells in the peripheral blood is significantly higher than in healthy controls, especially during the acute onset and active chronic stages (Holstein et al., 2021). Moreover, the levels of Th17-associated molecules (IL-17A and CCL20) in the serum, and the relative expression levels of ROR γ t, CCR6 and CCL20 is also relatively higher in patients with PV than in controls (Asothai et al., 2015). Th17 cells are also present in lesional skin (Arakawa et al., 2009): accordingly, a comparison of the expression profiles of lesional versus perilesional and healthy skin from a patient with pemphigus identified an IL-17A-dominated immune signature, with high expression of genes involved in the IL-17A signalling pathway (Holstein et al., 2021).

Alongside Th1, Th2 and Th17 cells are T follicular helper cells (Tfh): these are a subset of CD4⁺ T lymphocytes expressing the transcription factor BCL6, and CXCR5, which enable them to migrate into germinal centres where they are required for the selection of high-affinity antibody-producing B cells and the development of memory B cells (Morita et al., 2011; Craft, 2012). Tfh cells also express the surface receptors programmed cell death protein-1 (PD-1), inducible T cell costimulator, and CD40L, and secrete IL-21 to promote B cell growth, activation, immunoglobulin class-switching and differentiation into memory B cells and plasmablasts (Zotos et al., 2010). Early indications of a role for Tfh cells in pemphigus came from studies showing that the frequency of circulating Tfh cells (defined as CD4⁺CXCR5⁺ T cells) and plasma concentrations of IL-21 were both significantly higher in patients with PV compared to controls (Holstein et al., 2021); and identified autoreactive IL-21-secreting cells in 50% of patients with PV (Hennerici et al., 2016). In addition, frequencies of Th17 and Tfh17 cells in the blood of patients with pemphigus correlate with levels of Dsg-specific CD19⁺CD27⁺ memory B cells (Maho-Vaillant et al., 2021), while patients with acute pemphigus exhibit higher levels of Dsg3-autoreactive Tfh17 cells (Hennerici et al., 2016). Moreover, *in vitro* coculture experiments revealed that Tfh17 cells are primarily responsible for inducing Dsg-specific autoantibody production by B cells (Holstein et al., 2021). Leading on from this, targeting the inducible co-stimulator expressed on CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh cells suppressed the progression of PV in a murine model (Kim et al., 2020). All these findings show that Tfh17 cells are critically involved in the pathogenesis of pemphigus and offer novel targets for therapeutic intervention.

A major cell type tasked with preventing autoimmunity in the body is regulatory T cells (Treg), which exhibit a TCR $\alpha\beta$ ⁺Foxp3⁺CD4⁺ phenotype and develop in the thymus (Sakaguchi et al., 1995; Peterson, 2012). Treg cells possess

potent immune-suppressive activity and their main role is to control inflammation and immune responses to self-antigens. Various studies have demonstrated that the proportion of Treg cells in the blood of patients with PV is markedly lower than in healthy donors (Veldman et al., 2004). Similar trends are observed in patients with PV in the acute onset and remittent stages: frequencies of Th17 and Treg cell populations are inversely correlated, indicating that the balance of Th17/Treg cells is disrupted in PV (Xu et al., 2013; Asothai et al., 2015, 4). Similarly, a lower ratio of Dsg3-specific type 1 regulatory T cells (Tr1) to Th2 cells in patients with PV has been described (Veldman et al., 2006). *In vivo*, mouse models of PV have demonstrated that Tregs control anti-Dsg3 antibody production, and that adoptive transfer of Tregs or the depletion of endogenous Tregs suppresses and increases anti-Dsg3 antibody production, respectively (Yokoyama et al., 2011). Alongside, *in vitro* studies have shown that Dsg3-specific Tr1 cells secrete IL-10, TGF- β , and IL-5 upon autoantigen stimulation and inhibit the proliferation of Dsg3-responsive, auto-reactive helper T clones in an autoantigen- and cell-number- dependent manner (Veldman et al., 2004). This study suggests that Treg cells are involved in the maintenance and restoration of tolerance against autoantigens in PV. Recent work also suggests that Treg cells from patients with PV may have defective CCR4-CCL22 ligand interactions (Asothai et al., 2015), which could lead to reduced homing to the sites of skin lesions.

The skin also provides a niche for long term tissue-resident memory T (TRM) cells to accumulate, where they can mediate durable protective immunity but may also be involved in driving inflammatory diseases (Ho and Kupper, 2019). Recently, a study reported the over-representation of CD4⁺ TRM in the lesional skin of patients with pemphigus (Zou et al., 2021). These T follicular helper-like CD4⁺ TRM cells were thought to promote local autoantibody production, which could result in the formation and recurrence of lesions. Another study suggested that the long-lasting response to rituximab in pemphigus could rely 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 (Maho-Vaillant et al., 2021). These results support the therapeutic targeting of Tfh-like TRM cells in pemphigus treatment, perhaps via IRF4 which might serve as potential therapeutic target (Zou et al., 2021). Understanding the changes in phenotype, functions, and interactions of these, and other, T cell subsets is key to understanding the pathogenesis of pemphigus and for the development of new targeted therapeutics.

Myeloid Cells

The myeloid cell population represents a major compartment of the immune system and includes dendritic cells, macrophages, monocytes and neutrophils (Bassler et al., 2019). Dermal dendritic cells (cDC1, cDC2) and epidermal Langerhans cells (LCs) represent the specialized antigen presenting cells of the skin and the functional "bridge" between innate and adaptive immunity. They are considered as sentinels of the skin that defend against pathogens by controlling the innate immune cell wave infiltrating the area during infection (Del Fresno

et al., 2018; Janela et al., 2019) as well as by shaping the B and T cell mediated immune response: accordingly, they are key players in the maintenance of tolerance. Despite this, little is known of the role of the myeloid compartment in PV pathogenesis.

The frequency of myeloid DCs in the blood of patients with pemphigus is increased, and these cells exhibit altered expression of DC-associated stimulatory (CD40 and CD80) and inhibitory (PSGL1 and ILT3) markers compared to healthy donors (Das et al., 2020). These observations suggest a potential role of DC dysregulation in the immunopathogenesis of pemphigus. A recent study demonstrated that high numbers of LCs are present in perilesional skin from patients with pemphigus (Das et al., 2020); while *in vitro* work showed that LCs were able to capture the epidermal antigen Dsg3 via langerin and to present this antigen to T cells (Kitashima et al., 2018). Interestingly, LCs express the IL-2 receptor complex, and disruption of IL-2 signalling in LCs inhibits LC-mediated regulatory T cell expansion *in vitro* (Kitashima et al., 2018). Therefore, LCs may be important mediators of peripheral tolerance against epidermal autoantigens via IL-2 signalling, though this has yet to be directly demonstrated in pemphigus.

Another population of cells that exhibits potentially significant changes in pemphigus is myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). This heterogeneous group of immature myeloid cells incorporates granulocytic or polymorphonuclear-like MDSCs (PMN-MDSCs) and monocytic MDSCs (M-MDSCs) (Gabrilovich and Nagaraj, 2009), which inhibit T cell activity via several mechanisms (Nagaraj et al., 2010). A population of CD66b + CD11b + PMN-MDSCs is expanded in the peripheral blood of patients with active pemphigus (Oktem et al., 2021), but not those in remission (Neri et al., 2021). *In vitro*, these PMN-MDSCs can suppress allogeneic T-cell proliferation and exhibit high levels of expression of characteristic effector molecules such as arginase I and interleukin-10 (Neri et al., 2021). In addition, a correlation between MDSC frequency and Th2/Th1 cell ratio has been highlighted, which suggests a possible role of these cells as regulators of Th cell responses in pemphigus (Neri et al., 2021).

Plasmacytoid DCs (pDCs), which were long-thought to be part of myeloid lineage but in fact come from a lymphoid progenitor (Dress et al., 2019), could also have a possible role in pemphigus pathogenesis. pDCs seems to be recruited at very high level into the lesional skin of pemphigus patients (Ramadan et al., 2019). It is thus possible that pDCs might be involved in the initial mechanisms leading to autoantibody production, but this has yet to be formally investigated.

It has been demonstrated in autoimmune diseases such as lupus, rheumatoid arthritis and small vessel vasculitis that neutrophil extracellular traps (NETs) are linked with immune complexes and responsible for tissue inflammation and polyclonal activation of B-cell as well as memory B-cell activation (Yu and Su, 2013; Delgado-Rizo et al., 2017; Apel et al., 2018; O'Neil et al., 2019). As neutrophil can be found in the skin of pemphigus, a clinical trial aims to assess the effects on B-cell activation and the phenotypic changes in B-cell population from pemphigus patients after stimulation by NETs (NCT04117529). The understanding of the link between

innate and adaptive immunity is essential for a direct targeting of the different actors of the diseases.

COMPREHENSION OF THE PEMPHIGUS BY USING *IN VIVO* MODEL OF THE DISEASE

As discussed above, there are many aspects of the aetiology, pathogenesis and treatment of pemphigus that we have yet to fully understand: these diseases are rare—very rare in the case of some variants and sub-variants—which limits opportunities for clinical studies, and robust insights can be hard to glean from the type of mechanistic experiments that are possible using human cells *in vitro*. In the past three decades, experiments using different mouse models of pemphigus have led directly or indirectly to the identification of the dominant autoantigens, the discovery of autoreactive T cells and B cells and their roles in the production of pathogenic IgG autoantibodies. These findings represent the sum of multiple studies employing different *in vivo* models, each focused on specific aspects of the autoimmune cascade, from loss of immunological tolerance on the level of T and B cells to the pathogenic effects of autoantibodies upon binding to their target autoantigen.

The first mouse model of pemphigus was the passive transfer model, in which IgG from the sera of patients with PV is injected intraperitoneally into neonatal mice, resulting in the formation of cutaneous blisters and erosions and reproducing the clinical, histologic, ultrastructural and immunologic features of the disease (Anhalt et al., 1982). Studies in these mice provided the first evidence that PV IgG alone are pathogenic *in vivo*, and facilitated the dissection of the mechanism of blister formation (Schulze et al., 2012). Later, the need to study the mechanisms leading to the generation of pathogenic autoantibodies in PV drove the development of an active disease model: Dsg3^{-/-} mice, lacking self-tolerance against naturally expressed Dsg3 (Koch et al., 1997), were immunized against Dsg-3 to generate a source of Dsg3-reactive T and B cells, which were then isolated and injected into immune-deficient (Rag2^{-/-}) but Dsg3^{+/+} recipients to induce a Dsg3-specific autoimmune response *in vivo* (Amagai et al., 2000; Tsunoda et al., 2003; Aoki-Ota et al., 2004). The recipient mice developed oral erosions with suprabasal acantholysis that was induced by the stable production of a panel of Dsg3-specific autoantibodies (Ohya et al., 2002). A deeper analysis of the active pemphigus mouse model revealed that, in these mice, a single Dsg3-specific CD4⁺ T-cell clone was able to induce a clinical phenotype in recipient mice by activating Dsg3-reactive B cells (Takahashi et al., 2008).

A major criticism of the passive-transfer and active pemphigus mouse models is that they cannot take account of the genetic components of pemphigus predisposition, which are known from human studies to be significant determinants of disease. In response, a humanized HLA-class II transgenic mouse model of PV was developed (Eming et al., 2014). In this mouse, antigen presentation to CD4⁺ T cells is restricted to human HLA alleles, which allows the characterization of the loss of self-tolerance

against human Dsg3 in an HLA-restricted *in vivo* model system (Eming et al., 2014). The immunization of HLA-DRB1*04:02-transgenic mice with immunodominant Dsg3 peptides generates a CD4⁺ T cell-dependent immune response against human Dsg3 along with the production of pathogenic Dsg3 reactive IgG antibodies (Eming et al., 2014). This model therefore allows investigation of the communication between B cells and T cells that underpins the production of anti-Dsg3 IgG, leading to the discovery that the use of anti-CD40L or the depletion of CD4⁺ T cells abolishes the induction of pathogenic anti-Dsg3 IgG. Furthermore, when Treg were induced in these mice by injection with anti-CD28 antibodies, researchers observed a reduced humoral Dsg3-specific immune response, which supports the hypothesis that the Dsg3-specific CD4⁺ T-cell dependent immune pathogenesis of PV is modulated by Treg (Schmidt et al., 2016).

Whilst these studies, in conjunction with clinical data, have supported major steps forward in our understanding and treatment of pemphigus in recent years, significant challenges remain. For example, our knowledge of the initiation of pemphigus is severely limited as we lack a spontaneous model of the disease. Similarly, our understanding of immune-pathogenesis is almost completely restricted to Dsg3 as the target autoantigen, despite knowledge from human patients that this is only one part of the pemphigus picture. A pressing need in the field is the development of a model that reproduces the full complexity of the disease, including multi-pathogenic mechanisms that target different autoantigens. The impact of the lack of such a model is nowhere clearer than in the development of novel therapeutics to treat pemphigus disease.

PEMPHIGUS TREATMENT

Prior to the era of systemic corticosteroids, 75% of patients with pemphigus were dying within the first year of the disease (Bystryn, 1996). Complications such as infections or nutritional deficiency contributed significantly towards this high mortality. The introduction of systemic corticosteroids and subsequent use of other immunomodulatory or immunosuppressive agents has brought a marked improvement in survival (Bystryn, 1996), however the level of immunosuppression required to ameliorate symptoms has created its own problems. More recently, advances in our understanding of the pathogenesis of pemphigus and the biological mechanisms of therapeutics have led to a paradigm shift in the treatment of this disease, from blanket immunosuppression towards a more targeted restriction of autoimmunity.

Conventional Systemic Immunosuppressants/Immunomodulators

Immunosuppression with systemic corticosteroids in the form of oral prednisone or prednisolone frequently remain either the initial or mainstay of treatment for pemphigus. Different dosing schedules are employed depending on the severity of the disease:

they are typically initiated at a dose of 0.5 to 1.5 mg/kg/day to achieve initial control of the disease (Hertl et al., 2015; Harman et al., 2017); while more extreme cases may be treated with either intravenous pulse methylprednisolone (500–1,000 mg daily for three to five consecutive days) or dexamethasone 100 mg daily for three consecutive days, with or without concomitant cyclophosphamide (Pasricha et al., 1995; Werth, 1996; Saha et al., 2009). Corticosteroids are effective in autoimmune diseases as they exert strong anti-inflammatory effects and induce apoptosis of lymphocytes (Shimba and Ikuta, 2020). However, as morbidity and mortality from cumulative long-term corticosteroid use is significant (Razzaque Ahmed and Moy, 1982), various non-steroid immunosuppressive agents have been trialed in a bid to improve outcomes in these patients.

Initial attempts to treat pemphigus with non-steroid immunosuppressive agents such as azathioprine, mycophenolate mofetil and cyclophosphamide achieved mixed results: when analysed together, they seemed to reduce the risk of relapse in pemphigus (Atzmony et al., 2015). However, these medications individually were not shown to be better in achieving remission, reducing deaths or reducing relapse compared to corticosteroids alone (Martin et al., 2009). Nonetheless, both azathioprine and cyclophosphamide showed steroid-sparing effects and mycophenolate demonstrated a significant effect on disease control (Martin et al., 2009). Azathioprine is often used at a dose of 2–3 mg/kg/day, mycophenolate mofetil at a dose of 2–3 g/day and cyclophosphamide at 75–150 mg/day orally or 500–1,000 mg monthly intravenously. Due to its toxicity, cyclophosphamide is not widely used and is usually only considered in severe recalcitrant cases where other therapeutic options are not available or are contraindicated (Atzmony et al., 2015).

Methotrexate, a dihydrofolate reductase inhibitor, is the earliest steroid-sparing agent used in the treatment of pemphigus. It fell out of favour due to its associated toxicities when used at higher dose. It was not until later, when low to moderate doses (ranging 15–20 mg/week) were employed that it re-emerged as a safe and effective adjunct therapy in pemphigus (Gürçan and Razzaque Ahmed, 2009). Dapsone, with its ability to interfere with neutrophil chemo-attractants, is often used in the treatment of pemphigus with a predominantly neutrophilic infiltrate, such as pemphigus foliaceus, IgA pemphigus and pemphigus herpetiformis (Kasperkiewicz et al., 2014; Porro et al., 2019; Kridin et al., 2020). Dapsone is also an appropriate adjunctive steroid-sparing agent for the treatment of patients with PV whose disease was initially controlled with corticosteroids (Werth et al., 2008).

Anti-CD20 Antibody Therapy

The latest game changer in the treatment of pemphigus is rituximab, a murine-human chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (human Fc portion associated with a murine variable region) which targets B cells expressing CD20, and was initially developed and used to treat B cell malignancies (Grillo-López, 2000). First trialed in PNP in 2001 (Heizmann et al., 2001) and in PV in 2002 (Salopek et al., 2002), rituximab is now considered by many to be the primary therapeutic option in pemphigus.

Injection of rituximab induces rapid depletion of B cells, including autoreactive B cells, from the peripheral blood of patients, with the B cell pool being reconstituted over the next 6–12 months from non-depleted progenitors (Mouquet et al., 2008). CD20 is expressed on the surface of B cells from the late pre-B-cell stage in the bone marrow, through naïve follicular B cells and into the memory B cell population; but the long-lived plasma cells do not express this molecule and survive in specific niches including the bone marrow, gut-associated lymphoid tissue (GALT) and skin-associated lymphoid tissue (SALT) (Lightman et al., 2019; Zhou et al., 2020). Thus, depletion of mature B cells and short-lived plasma cells in patients with PV leads to lowering of autoreactive anti-Dsg antibodies in the serum, while antibodies produced by long-lived plasma cells, such as those directed against tetanus and pneumococcus, remain unchanged (Mouquet et al., 2008). Although rituximab is more expensive than broad spectrum immunosuppressants, a recent study showed that the initially higher cost of rituximab was almost completely off-set by costs related to management of flares and relapses in patients treated with the standard corticosteroid regimen (Hébert et al., 2020).

The therapeutic efficacy of rituximab treatment in patients with pemphigus seems to operate on multiple levels. Prolonged and continuous repopulation of naïve B cells bearing a new repertoire and a markedly delayed reappearance of memory B cells are seen after rituximab treatment: numbers of CD19⁺ B-lymphocytes even 6 years after treatment are much lower than at baseline (Colliou et al., 2013). This prolonged blockage of B cell maturation also inhibits the IgM to IgG class switching process, thereby reducing levels of autoimmune IgG⁺ circulating B lymphocytes and autoantibodies (Colliou et al., 2013); such long-lasting modification of the naïve/memory-B-cell ratio accounts for the prolonged therapeutic effect of rituximab in patients with pemphigus. In addition, transitional B-cell and IL-10-secreting regulatory B cell (B reg) populations seem to expand during the B cell repopulation (Colliou et al., 2013); this could be significant because B reg cells can down-regulate inflammation and may be involved in the maintenance of long term immune tolerance (Lund and Randall, 2010; Mauri and Menon, 2017; Cao et al., 2019).

However, post-rituximab relapses do occur, and are thought to be linked to the re-emergence of anti-Dsg B cell clones that have lost self-tolerance (Hammers et al., 2015). Relapse occurs in more than 80% of PV patients over a median period of 79 months (Colliou et al., 2013), and is more likely when patients have severe disease at treatment outset and/or persistently high anti-Dsg1/3 antibody levels 3 months after treatment (Mignard et al., 2020); conversely, older patients and those given higher doses of the drug are less likely to experience early relapse (Kushner et al., 2019). It is plausible that higher doses of rituximab achieve a deeper B cell depletion and that the weaker immune systems of the elderly make the re-emergence of anti-Dsg B cell clones less likely. Alongside, long-term follow-up of auto-reactive B cells and antibodies in rituximab-treated patients with pemphigus demonstrated a complex regulatory process: in patients in remission, there were fewer autoreactive B cells than in patients with active pemphigus, and within that B cell

population there was a higher proportion of IgM Dsg3⁺ cells than IgG Dsg3⁺ cells, in association with a rearrangement in Ig repertoire which had switched from an oligoclonal to polyclonal profile (Colliou et al., 2013; Hébert et al., 2019). In addition, the remaining autoreactive anti-Dsg antibodies detected in patients in remission seem to target non-pathogenic epitopes of Dsg (Müller et al., 2010).

It may be possible to reduce relapse rates, or lengthen the time to relapse, by modifying the approach to the use of rituximab in pemphigus patients. In a recent randomised control trial, 89% of patients treated with two infusions of 1 g of rituximab given a fortnight apart at baseline, and with 0.5 g at 12 and 18 months, combined with short-term prednisolone (0.5–1.0 mg/kg/day for 3–6 months) were in complete remission off therapy at 2 years, compared with only 34% of those given prednisone alone (1.0–1.5 mg/kg/day) (Joly et al., 2017). Importantly, the cumulative prednisolone dose used, and the number of severe adverse events in the rituximab-treated group, was three times and two times lower respectively, when compared to the prednisone-only group.

Alongside the relapse-rate, unfortunately, 10–20% of patients with pemphigus seem to be resistant to rituximab therapy (Joly et al., 2017). Trying to understand this phenomenon, a recent study showed that memory and germinal autoreactive B cells may persist in lymphoid tissues or ectopic lymphoid-like structures in PV lesions in cases of rituximab resistance (Zhou et al., 2020). Furthermore, the authors showed similar persistence of autoreactive CD4⁺ Th cells, which provide a crucial help to B cells for the secretion of autoantibodies. Post rituximab treatment, the disruption of immune tolerance could lead to the appearance of new autoreactive B cells, and the non-depletion of the long-lived autoreactive plasma cells with persistent production of anti-Dsg 3 antibodies could similarly explain the resistance to treatment in some patients (Hammers et al., 2015). There may also be a link between the production of human anti-chimeric antibodies (HACA) to the murine fragments of rituximab which may hamper the effectiveness of subsequent doses and contribute to a lack of therapeutic response (Lunardon and Payne, 2012). In addition, a downregulation of CD20 in some CD27⁺ memory B cells and the presence of an alternative transcript of the CD20 (D393–CD20), which was described in lymphoma and pemphigus could explain an impairment of the rituximab binding and the resultant lack of B cell depletion (Gamonet et al., 2014). Taken together, multiple pathways of incomplete/non-responsiveness to rituximab treatment have been suggested, and ways of overcoming these limitations and/or new therapies remain urgently needed.

Rituximab's targeting of B-cells also has the side-effect of leaving patients highly susceptible to bacterial infections, particularly those of the respiratory tract and skin (Goh et al., 2007; Kamran et al., 2013). Similarly, viral infections or reactivation of latent viruses such as herpes simplex (HSV), cytomegalovirus (CMV), hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) viruses have been described in lymphoma or pemphigus patients who received rituximab (Suzan et al., 2001; Goh et al., 2007; Yeo et al., 2009; Nooka et al., 2011). Screening or prophylaxis for HSV and CMV infections is

generally not regarded as necessary, but pre-treatment screening for HBV and HCV is (Sagnelli et al., 2012; Pattullo, 2015; Reddy et al., 2015). However, establishing a direct causal link between infections and rituximab therapy is often confounded by the concomitant use of other immunosuppressive agents and generalised immune dysfunction induced by the underlying diseases for which rituximab is used as therapy. As rituximab does not affect CD4⁺/CD8⁺ T-cell circulating numbers, susceptibility to bacterial infection and opportunistic infections after rituximab therapy may then be partly explained by the disruption of B cell's role in T-cell activation and optimal CD4⁺ memory response. Hypogammaglobulinemia, which has been associated with multiple infusions of rituximab for rheumatic autoimmune diseases and lymphoma, is a risk factor for serious infections (Casulo et al., 2013; Yusof et al., 2019). However, hypogammaglobulinaemia has not been reported in pemphigus patients and it remains to be seen with longer term follow up of pemphigus patients undergoing multiple rituximab infusions. Concerns of progressive multifocal leukoencephalopathy has largely been reassured by the findings of post-marketing surveillance that this rare opportunistic infection is mainly seen in oncology (lymphoma) patients (Focosi et al., 2019).

The use of rituximab has undeniably revolutionised the treatment of pemphigus for many patients but its high initial cost, the high rate of relapse (Colliou et al., 2013) lowered resistance to infection and further lower immunogenicity to several vaccines remain significant drawbacks. These factors have driven more research aiming to discover and develop more targeted therapeutics with improved safety and efficacy profiles.

Adjunct Therapies

In the absence of a single therapy that works across all patients with pemphigus, different treatments have been trialled in combination with more conventional therapies, aiming to enhance the overall effect. One such adjunct therapy for severe recalcitrant pemphigus is high dose intravenous immunoglobulins (IVIg), given at 2 g/kg across five daily doses per month (Amagai et al., 2009) in addition to conventional immunosuppressive agents or rituximab (see below) (Jolles, 2001; Grando, 2019). Initial IVIg therapy rapidly elevates total circulating Ig levels, which is thought to stimulate homeostatic antibody-catabolic mechanisms, leading to lowering of serum levels of IgG1 and IgG4 anti-Dsg 1 and Dsg 3 antibodies (Green and Bystryn, 2008) while normal antibodies are replaced by those in subsequent IVIg doses: this is a particularly useful treatment when fast onset of therapy and lower risk of infection is needed. Combining rituximab and IVIg can be effective for the treatment of refractory pemphigus cases and may even induce long-term complete remission with lower risk of infection (Hamadah et al., 2019); accordingly, a clinical trial was started in June 2020 to evaluate the efficacy and safety of early use of rituximab with or without IVIGs in patients with moderate to severe pemphigus (NCT04400994). Immunoabsorption, which also rapidly removes anti-Dsg IgG from the circulation, has also been trialled in conjunction with

conventional immunosuppressive treatment and intravenous rituximab (Eming and Hertl, 2006; Behzad et al., 2012). In its current form, immunoglobulins are non-specifically adsorbed and removed, but studies are underway to develop anti-Dsg immunoglobulin-specific adsorption (Langenhan et al., 2014); it is, however, not easily available in many parts of the world, limiting its potential for widespread use.

Complementary to systemic therapeutic options, local treatment of mucosal - especially oral - lesions of pemphigus should not be overlooked. Poor oral hygiene can be a contributory factor for persistent oral erosions in pemphigus (Gambino et al., 2014), and topical analgesics or anaesthetics (e.g., lidocaine 2% gel) can be used prior to eating or brushing of teeth. Topical medium or high potency corticosteroids (e.g., clobetasol propionate 0.05% in adhesive paste) can also be applied directly to the lesions (Lozada-Nur et al., 1994) or used as mouth gargle. Alongside, the use of topical calcineurin inhibitors and cyclosporine mouthwash may be also beneficial (Gooptu and Staughton, 1998; Hodgson et al., 2003). *Candida* infection is a common occurrence in patients with mucosal pemphigus who are treated with topical or systemic glucocorticoids (Lozada-Nur et al., 1994): oral nystatin swish-and-swallow or mouthwash can be used as prophylaxis. Dietary advice in favour of a soft diet and the avoidance of spicy or very hot foods can also be helpful for patients.

NOVEL TREATMENT IN THE PIPELINE

As we learn more about the pathogenesis of pemphigus, the development of more targeted therapeutic approaches with improved safety and efficacy profiles is gradually becoming possible.

Recent studies characterising the immune features of pemphigus lesions themselves have paved the way for innovative local treatment strategies. For example, intralesional delivery of rituximab, which has already been used in the treatment of lymphoma (Davies et al., 2017), has been proposed as a way of targeting the diffuse ectopic lymphoid-like structures that are commonly seen in lesions of both PV and PF and to treat refractory oral pemphigus vulgaris (Vinay et al., 2015; Zhou et al., 2020). Disruption of these lymphoid-like structures, which are composed of T cells, dendritic cells, centroblasts, plasmablasts and plasma cells might therefore disrupt the niche that supports the *in situ* B cell differentiation, clonal expansion and production of autoreactive antibody in the skin of patients with pemphigus. Identification of the cell composition and exploration of the impact of the injection of steroids into lesions of patients with pemphigus that harbour ectopic lymph node-like structures is ongoing (NCT04509570).

Some novel approaches target specific obstacles within current therapeutic settings. Aiming to restore the efficacy of anti-CD20 therapy in rituximab patients with HACA, subcutaneous injection of Ofatumumab, a fully human anti-CD20 IgG₁ antibody with increased binding affinity for CD20, has been successfully trialled in a single patient (Rapp et al., 2018), but

has yet to be assessed in a larger cohort. Similarly, veltuzumab, a second generation humanized anti-CD20 antibody, has been successfully used in a case of rituximab-refractory PV (Ellebrecht et al., 2014). The development of these second and third generation anti-CD20 antibodies, which possess superior B cell-depleting qualities and higher binding affinities compared to rituximab, might represent an important step forward in the treatment of pemphigus and other autoimmune B cell diseases.

A different type of treatment obstacle can be simply a practical limitation, as in the case of IVIG: these products are generally considered safe and effective, but their production requires an abundant supply of human plasma in order to generate the large doses of product (up to 2 g/kg body weight) needed for therapy.

To overcome this supply limitation, antibodies with high affinity for the neonatal Fc receptor (FcRn) have been developed. These antibodies represent a key determinant actor for IgG levels and functions (Pyzik et al., 2019). FcRn-targeting therapeutics aim to block the binding of IgG and IgG immune complexes to the FcRn, thereby accelerating their breakdown and inducing a reduction in overall plasma IgG levels, including the levels of pathogenic autoantibodies (Blumberg et al., 2019).

Data from a phase 1b/2a study using ALXN1830 (NCT03075904), a humanized affinity-matured IgG4-kappa monoclonal antibody with high affinity for the neonatal Fc receptor, has shown major improvements in both cutaneous and mucosal disease, and an overall acceptable safety and tolerability profile (Werth et al., 2021). In this trial, ALXN1830-associated clinical improvement was accompanied by a similarly rapid and significant decrease in levels of total IgG, all individual IgG subclasses, and IgG immune complexes. In addition, this study thereby provides evidence that IgG circulating immune complexes may be involved in the pathogenesis of pemphigus. Another promising anti-FcRn therapeutic is also being trialled in pemphigus. Efgartigimod is a human IgG1 antibody Fc-fragment, a natural ligand of FcRn, that has been engineered for increased affinity to FcRn compared with endogenous IgG (Zuercher et al., 2019). Proven safe and effective in patients with myasthenia gravis (Howard et al., 2021), results from a completed phase two trial of efgartigimod in patients with PV (NCT03334058) have shown that it is well-tolerated and exhibited an early effect on disease activity and outcome parameters, providing support for further evaluation as a therapy for pemphigus (Goebeler et al., 2021). Two phase 3 clinical trials assessing the early and long-term efficacy and safety of a subcutaneous formulation of efgartigimod in adults with pemphigus is on-going (NCT04598451 and NCT04598477).

Focussing on the immune-associated SNPs that have been linked with pemphigus, Assaf S et al. recently demonstrated through a series of experiments on how ST18 contributed to destabilization of cell-cell adhesion in a tumour necrosis factor (TNF)- α -dependent manner, potentially opening up new therapeutic option of using TNF- α inhibitors in the treatment of pemphigus (Assaf et al., 2021).

Targeting another aspect of the biology of B cells, such as their survival or their differentiation into plasma cells, is a useful approach that has been tested in SLE and could be applied to the treatment of pemphigus. The use of belimumab, a

monoclonal human IgG1 antibody that binds to soluble B lymphocyte stimulator (BLyS) or B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF) (Möckel et al., 2021), or atacicept, a fully human recombinant fusion protein that blocks BLyS and the proliferation-inducing ligand (APRIL) (Kaegi et al., 2020), might be a promising treatment of pemphigus. This is further supported by the recent finding that a modification of the BAFF/BAFF receptor axis in patients with pemphigus could explain the high number of relapses following standard corticosteroid treatment alone versus with rituximab (Hébert et al., 2021). New therapies such as Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors have also emerged as a potential treatment option: BTK inhibitors seem to be able to neutralize pathogenic autoantibodies, to inhibit new autoantibody production and to possess anti-inflammatory effects (Weber et al., 2017). A trial involving the use of a BTK inhibitor, PRN 1008, in patients with PV (NCT02704429) has been completed and recently published (Murrell et al., 2021). The study suggests that BTK inhibition may be a promising treatment strategy and supports further investigation of such inhibitor for the treatment of pemphigus.

Recently, chimeric antigen receptor (CAR) T cell technology has revolutionized cancer immunotherapy (reviewed in Mohanty et al. (2019)). This approach uses T cells from the patient's own blood that are genetically manipulated in research laboratories to express a CAR capable of recognizing a specific cell type uniquely expressing the target antigen. In the case of pemphigus, researchers have engineered a chimeric autoantibody receptor (CAAR), with Dsg3 as the extracellular domain in order to generate CAAR-T cells that recognize the Dsg3-specific BCR on autoreactive B cells and induce their elimination (Ellebrecht et al., 2016). Preclinical study has demonstrated that DSG3-CAART could be a precise therapy for PV (Lee et al., 2020). A phase one clinical trial to determine the maximum tolerated dose of Dsg3-CAART in mucosal dominant PV patients is ongoing (NCT04422912). Whilst this is potentially a promising step forwards, the efficacy of Dsg3-CAAR-T cell therapies in pemphigus may be limited by the single antigen focus, and so the repertoire of recognition might need to be expanded in future trials if this approach is found to be safe and well-tolerated.

VACCINATION AND PEMPHIGUS

Vaccination strategy and Pemphigus treatment are in need of more studies especially in this time of COVID-19 pandemic. The effect of rituximab and other anti-CD20 monoclonal antibodies on vaccine response has been studied for inactivated vaccines (Baker et al., 2020). These studies have suggested that rituximab recipients mount attenuated yet meaningful vaccine responses. Concerning live attenuated vaccines, no study addressing their immunogenicity has been started due to the safety concerns regarding the use of these vaccines in rituximab recipients. In addition, no studies have evaluated yet the safety and immunogenicity of messenger RNA vaccines or viral vector vaccines, which are among the leading COVID-19 vaccine

candidates. To gain knowledge on COVID-19 vaccine and pemphigus, a clinical trial has been started recently in August 2021 to compare the immune response to different COVID-19 vaccine booster doses (Moderna COVID-19 vaccine, Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine, or Janssen COVID-19 vaccine) in participants with autoimmune disease requiring immunosuppressive medications, including pemphigus patients (NCT05000216).

CONCLUSION

Alongside advances in our understanding of pemphigus pathogenicity, the number of therapeutic options to treat pemphigus has increased over the last decade, with more targeted therapies and refined diagnostic techniques beginning to emerge. However, with better definition of the clinical subtypes of pemphigus, the aetiology and immune pathogenesis of these diseases is revealed to be more and more complex, and still

requires further investigation. Better comprehension of the early stages of pemphigus, the role of innate and adaptive immune cells - most notably dendritic cells and full analysis of the involved B cells' biology will be required. To support this, the field should develop new mouse models that incorporate all the immune players necessary for the emergence of pemphigus variants, and that can be used to test new and innovative therapies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge Dr Christelle Leroux for sharing photos of different Pemphigus variants.

REFERENCES

Abasq, C., Mouquet, H., Gilbert, D., Tron, F., Grassi, V., Musette, P., et al. (2009). ELISA Testing of Anti-desmoglein 1 and 3 Antibodies in the Management of Pemphigus. *Arch. Dermatol.* 145, 529–535. doi:10.1001/archdermatol.2009.9

Abida, O., Masmoudi, A., Rébâ, A., Ben Ayed, M., Mahfoudh, N., Kallel-Sellami, M., et al. (2009). The Familial Feature of Tunisian Endemic Pemphigus Foliaceus. *Br. J. Dermatol.* 161, 951–953. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.0386.x

Abrèu-Vélez, A. M., Reuter, E. H., Montoya, F., Bollag, W. B., and Hashimoto, T. (2003a). Analyses of Autoantigens in a New Form of Endemic Pemphigus Foliaceus in Colombia. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, 609–614. doi:10.1067/s0190-9622(03)00852-1

Abrèu-Vélez, A. M., Hashimoto, T., Bollag, W. B., Tobón Arroyave, S., Abrèu-Vélez, C. E., Londoño, M. L., et al. (2003b). A Unique Form of Endemic Pemphigus in Northern Colombia. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, 599–608. doi:10.1067/s0190-9622(03)00851-x

Aghassi, D. (1998). Pemphigus Foliaceus Induced by Psoralen-UV-A. *Arch. Dermatol.* 134, 1300. doi:10.1001/archderm.134.10.1300-a

Razzaque Ahmed, A., and Blose, D. A. (1984). Pemphigus Vegetans. *Int. J. Dermatol.* 23, 135–141. doi:10.1111/j.1365-4362.1984.tb05688.x

Ahmed, A. R., Wagner, R., Khatri, K., Notani, G., Awdeh, Z., Alper, C. A., et al. (1991). Major Histocompatibility Complex Haplotypes and Class II Genes in Non-Jewish Patients with Pemphigus Vulgaris. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5056–5060. doi:10.1073/pnas.88.11.5056

Ahmed, A. R., Carrozzo, M., Caux, F., Cirillo, N., Dmochowski, M., Alonso, A. E., et al. (2016). Monopathogenic vs Multipathogenic Explanations of Pemphigus Pathophysiology. *Exp. Dermatol.* 25, 839–846. doi:10.1111/exd.13106

Allen, E. M., Giudice, G. J., and Diaz, L. A. (1993). Subclass Reactivity of Pemphigus Foliaceus Autoantibodies with Recombinant Human Desmoglein. *J. Invest. Dermatol.* 100, 685–691. doi:10.1111/1523-1747.ep12472348

Amagai, M., and Stanley, J. R. (2012). Desmoglein as a Target in Skin Disease and beyond. *J. Invest. Dermatol.* 132, 776–784. doi:10.1038/jid.2011.390

Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a Novel Epithelial Cadherin in Pemphigus Vulgaris, a Disease of Cell Adhesion. *Cell* 67, 869–877. doi:10.1016/0092-8674(91)90360-B

Amagai, M., Krapf, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J. R. (1992). Autoantibodies against the Amino-Terminal Cadherin-like Binding Domain of Pemphigus Vulgaris Antigen Are Pathogenic. *J. Clin. Invest.* 90, 919–926. doi:10.1172/JCI115968

Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K. J., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1995). Antigen-Specific Immunoadsorption of Pathogenic Autoantibodies in Pemphigus Foliaceus. *J. Invest. Dermatol.* 104, 895–901. doi:10.1111/j.1523-1747.ep12606168

Amagai, M., Nishikawa, T., Noursari, H. C., Anhalt, G. J., and Hashimoto, T. (1998). Antibodies against Desmoglein 3 (Pemphigus Vulgaris Antigen) Are Present in Sera from Patients with Paraneoplastic Pemphigus and Cause Acantholysis *In Vivo* in Neonatal Mice. *J. Clin. Invest.* 102, 775–782. doi:10.1172/JCI3647

Amagai, M., Komai, A., Hashimoto, T., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Yamada, T., et al. (1999). Usefulness of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Desmogleins 1 and 3 for Serodiagnosis of Pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 140, 351–357. doi:10.1046/j.1365-2133.1999.02752.x

Amagai, M., Tsunoda, K., Suzuki, H., Nishifuji, K., Koyasu, S., and Nishikawa, T. (2000). Use of Autoantigen-Knockout Mice in Developing an Active Autoimmune Disease Model for Pemphigus. *J. Clin. Invest.* 105, 625–631. doi:10.1172/JCI8748

Amagai, M., Ikeda, S., Shimizu, H., Iizuka, H., Hanada, K., Aiba, S., et al. (2009). A Randomized Double-Blind Trial of Intravenous Immunoglobulin for Pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 60, 595–603. doi:10.1016/j.jaad.2008.09.052

Amagai, M. (2009). The Molecular Logic of Pemphigus and Impetigo: the Desmoglein story. *Vet. Dermatol.* 20, 308–312. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00831.x

Amber, K. T., Valdebran, M., and Grando, S. A. (2018). Non-Desmoglein Antibodies in Patients with Pemphigus Vulgaris. *Front. Immunol.* 9, 1190. doi:10.3389/fimmu.2018.01190

Amerian, M. L., and Ahmed, A. R. (1985). Pemphigus Erythematosus. *Int. J. Dermatol.* 24, 16–25. doi:10.1111/j.1365-4362.1985.tb05349.x

Anhalt, G. J., Labib, R. S., Voorhees, J. J., Beals, T. F., and Diaz, L. A. (1982). Induction of Pemphigus in Neonatal Mice by Passive Transfer of IgG from Patients with the Disease. *N. Engl. J. Med.* 306, 1189–1196. doi:10.1056/NEJM198205203062001

Anhalt, G. J., Kim, S., Stanley, J. R., Korman, N. J., Jabs, D. A., Kory, M., et al. (1990). Paraneoplastic Pemphigus. *N. Engl. J. Med.* 323, 1729–1735. doi:10.1056/NEJM199012203232503

Anhalt, G. J. (2004). Paraneoplastic Pemphigus. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 9, 29–33. doi:10.1111/j.1087-0024.2004.00832.x

Aoki, V., Rivitti, E. A., and Diaz, L. A. (2015). Cooperative Group on Fogo Selvagem Research Update on Fogo Selvagem, an Endemic Form of Pemphigus Foliaceus. *J. Dermatol.* 42, 18–26. doi:10.1111/1346-8138.12675

Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Ota, T., Iwasaki, T., Koyasu, S., Amagai, M., et al. (2004). A Mouse Model of Pemphigus Vulgaris by Adoptive Transfer of Naive Splenocytes from Desmoglein 3 Knockout Mice. *Br. J. Dermatol.* 151, 346–354. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.06056.x

Apel, F., Zychlinsky, A., and Kenny, E. F. (2018). The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatic Diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 14, 467–475. doi:10.1038/s41584-018-0039-z

Arakawa, M., Dainichi, T., Yasumoto, S., and Hashimoto, T. (2009). Lesional Th17 Cells in Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus. *J. Dermatol. Sci.* 53, 228–231. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.09.008

- Asothai, R., Anand, V., Das, D., Antil, P. S., Khandpur, S., Sharma, V. K., et al. (2015). Distinctive Treg Associated CCR4-CCL22 Expression Profile with Altered Frequency of Th17/Treg Cell in the Immunopathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Immunobiology* 220, 1129–1135. doi:10.1016/j.imbio.2015.06.008
- Assaf, S., Malki, L., Mayer, T., Mohamad, J., Peled, A., Pavlovsky, M., et al. (2021). ST18 Affects Cell-Cell Adhesion in Pemphigus Vulgaris in a Tumour Necrosis Factor- α -dependent Fashion*. *Br. J. Dermatol.* 184, 1153–1160. doi:10.1111/bjd.19679
- Atzmony, L., Hodak, E., Leshem, Y. A., Rosenbaum, O., Gdalevich, M., Anhalt, G. J., et al. (2015). The Role of Adjuvant Therapy in Pemphigus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 73, 264–271. doi:10.1016/j.jaad.2015.04.038
- Baker, D., Roberts, C. A. K., Pryce, G., Kang, A. S., Marta, M., Reyes, S., et al. (2020). COVID-19 Vaccine-Readiness for Anti-CD20-depleting Therapy in Autoimmune Diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 202, 149–161. doi:10.1111/cei.13495
- Bassler, K., Schulte-Schrepping, J., Warnat-Herresthal, S., Aschenbrenner, A. C., and Schultze, J. L. (2019). The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 269–293. doi:10.1146/annurev-immunol-042718-041728
- Bastuji-Garin, S., Souissi, R., Blum, L., Turki, H., Nouira, R., Jomaa, B., et al. (1995). Comparative Epidemiology of Pemphigus in Tunisia and France: Unusual Incidence of Pemphigus Foliaceus in Young Tunisian Women. *J. Invest. Dermatol.* 104, 302–305. doi:10.1111/1523-1747.ep12612836
- Bastuji-Garin, S., Souissi, R., Blum, L., Turki, H., Nouira, R., Jomaa, B., et al. (1996). Comparative Epidemiology of Pemphigus in Tunisia and France. Incidence of Foliaceus Pemphigus in Young Tunisian Women. *Ann. Dermatol. Venerol.* 123, 337–342.
- Behzad, M., Möbs, C., Kneisel, A., Möller, M., Hoyer, J., Hertl, M., et al. (2012). Combined Treatment with Immunosuppression and Rituximab Leads to Fast and Prolonged Clinical Remission in Difficult-To-Treat Pemphigus Vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 166, 844–852. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10732.x
- Belloni-Fortina, A., Faggion, D., Pigozzi, B., Peserico, A., Bordignon, M., Baldo, V., et al. (2009/2009). Detection of Autoantibodies against Recombinant Desmoglein 1 and 3 Molecules in Patients with Pemphigus Vulgaris: Correlation with Disease Extent at the Time of Diagnosis and during Follow-Up. *Clin. Develop. Immunol.* 2009, 1–6. doi:10.1155/2009/187864
- Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L. A., Enghild, J. J., Chua, M. P., et al. (2005). Desmosome Signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 23778–23784. doi:10.1074/jbc.M501365200
- Berkowitz, P., Hu, P., Warren, S., Liu, Z., Diaz, L. A., and Rubenstein, D. S. (2006). p38MAPK Inhibition Prevents Disease in Pemphigus Vulgaris Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12855–12860. doi:10.1073/pnas.0602973103
- Berkowitz, P., Diaz, L. A., Hall, R. P., and Rubenstein, D. S. (2008). Induction of p38MAPK and HSP27 Phosphorylation in Pemphigus Patient Skin. *J. Invest. Dermatol.* 128, 738–740. doi:10.1038/sj.jid.5701080
- Berkun, Y., Mimouni, D., and Shoenfeld, Y. (2005). Pemphigus Following Hepatitis B Vaccination—Coincidence or Causality? *Autoimmunity* 38, 117–119. doi:10.1080/0891693040027078
- Bhol, K. C., and Razaque Ahmed, A. (2002). Production of Non-pathogenic Human Monoclonal Antibodies to Desmoglein 3 from Pemphigus Vulgaris Patient. *Autoimmunity* 35, 87–91. doi:10.1080/08916930290016655
- Blumberg, L. J., Humphries, J. E., Jones, S. D., Pearce, L. B., Holgate, R., Hearn, A., et al. (2019). Blocking Fc γ Rn in Humans Reduces Circulating IgG Levels and Inhibits IgG Immune Complex-Mediated Immune Responses. *Sci. Adv.* 5, eaax9586. doi:10.1126/sciadv.aax9586
- Brandt, O., Rafei, D., Podstawa, E., Niedermeier, A., Jonkman, M. F., Terra, J. B., et al. (2012). Differential IgG Recognition of Desmoglein 3 by Paraneoplastic Pemphigus and Pemphigus Vulgaris Sera. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1738–1741. doi:10.1038/jid.2012.1
- Brenner, S., Sasson, A., and Sharon, O. (2002). Pemphigus and Infections. *Clin. Dermatol.* 20, 114–118. doi:10.1016/s0738-081x(01)00254-1
- Brochado, M. J. P., Nascimento, D. F., Campos, W., Deghaide, N. H. S., Donadi, E. A., and Rosdino, A. M. (2016). Differential HLA Class I and Class II Associations in Pemphigus Foliaceus and Pemphigus Vulgaris Patients from a Prevalent Southeastern Brazilian Region. *J. Autoimmun.* 72, 19–24. doi:10.1016/j.jaut.2016.04.007
- Bystryn, J.-C., and Rudolph, J. L. (2005). Pemphigus. *The Lancet* 366, 61–73. doi:10.1016/S0140-6736(05)66829-8
- Bystryn, J.-C. (1996). The Adjuvant Therapy of Pemphigus. *Arch. Dermatol.* 132, 203. doi:10.1001/archderm.1996.03890260105016
- Cao, T., Shao, S., Fang, H., Li, B., and Wang, G. (2019). Role of Regulatory Immune Cells and Molecules in Autoimmune Bullous Dermatoses. *Front. Immunol.* 10, 1746. doi:10.3389/fimmu.2019.01746
- Capon, F., Bharkhada, J., Cochrane, N. E., Mortimer, N. J., Setterfield, J. F., Reynaert, S., et al. (2006). Evidence of an Association between Desmoglein 3 Haplotypes and Pemphigus Vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 154, 67–71. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06882.x
- Carcassi, C., Gottoni, F., Floris, L., Vacca, A., Mulargia, M., Arras, M., et al. (1996). HLA Haplotypes and Class II Molecular Alleles in Sardinian and Italian Patients with Pemphigus Vulgaris. *Tissue Antigens* 48, 662–667. doi:10.1111/j.1399-0039.1996.tb02689.x
- Carew, B., and Wagner, G. (2014). Cutaneous Pemphigus Vulgaris with Absence of Desmoglein 1 Autoantibodies. An Example of the Extended Desmoglein Compensation Theory. *Australas. J. Dermatol.* 55, 292–295. doi:10.1111/ajd.12154
- Carvalho, A. A., Santos Neto, D. A. D., Carvalho, M. A. D. R., Eleutério, S. J. P., and Xavier, A. R. E. D. O. (2019). Pênfigo Neonatal Em Filho De Mãe Com Pênfigo Vulgar: Relato De Caso. *Rev. Paul. Pediatr.* 37, 130–134. doi:10.1590/1984-0462/2019/37;1p0004
- Casulo, C., Maragulia, J., and Zelenetz, A. D. (2013). Incidence of Hypogammaglobulinemia in Patients Receiving Rituximab and the Use of Intravenous Immunoglobulin for Recurrent Infections. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 13, 106–111. doi:10.1016/j.clml.2012.11.011
- Chan, P. T., Ohyama, B., Nishifujii, K., Yoshida, K., Ishii, K., Hashimoto, T., et al. (2010). Immune Response towards the Amino-Terminus of Desmoglein 1 Prevails across Different Activity Stages in Nonendemic Pemphigus Foliaceus. *Br. J. Dermatol.* 162, 1242–1250. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09696.x
- Chapman, M. S., Dinulos, J. G. H., Habif, T. P., and Zug, K. A. (2018). *Skin Disease: Diagnosis and Treatment*. New York: Elsevier.
- Chen, J., Den, Z., and Koch, P. J. (2008). Loss of Desmocollin 3 in Mice Leads to Epidermal Blistering. *J. Cell. Sci.* 121, 2844–2849. doi:10.1242/jcs.031518
- Chernyavsky, A., Chen, Y., Wang, P. H., and Grando, S. A. (2015). Pemphigus Vulgaris Antibodies Target the Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors that Protect Keratinocytes from Apoptosis. *Int. Immunopharmacology* 29, 76–80. doi:10.1016/j.intimp.2015.04.046
- Chernyavsky, A., Amber, K. T., Agnoletti, A. F., Wang, C., and Grando, S. A. (2019). Synergy Among Non-desmoglein Antibodies Contributes to the Immunopathology of Desmoglein Antibody-Negative Pemphigus Vulgaris. *J. Biol. Chem.* 294, 4520–4528. doi:10.1074/jbc.RA118.006743
- Cho, A., Caldara, A. L., Ran, N. A., Menne, Z., Kauffman, R. C., Affer, M., et al. (2019). Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. *Cell Rep.* 28, 909–922. e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.066
- Cirillo, N., Lanza, A., and Prime, S. S. (2010). Induction of Hyper-Adhesion Attenuates Autoimmune-Induced Keratinocyte Cell-Cell Detachment and Processing of Adhesion Molecules via Mechanisms that Involve PKC. *Exp. Cell Res.* 316, 580–592. doi:10.1016/j.yexcr.2009.10.005
- Colliou, N., Picard, D., Caillot, F., Galbo, S., Le Corre, S., Jim, A., et al. (2013). Long-Term Remissions of Severe Pemphigus after Rituximab Therapy Are Associated with Prolonged Failure of Desmoglein B Cell Response. *Sci. Transl. Med.* 5, 175ra30. doi:10.1126/scitranslmed.3005166
- Costa, I. M. C., Cappel, M. A., and Keding, J. H. (2019). Clinical, Pathologic, and Immunologic Features of Pemphigus Herpetiformis: a Literature Review and Proposed Diagnostic Criteria. *Int. J. Dermatol.* 58, 997–1007. doi:10.1111/ijd.14395
- Cozzani, E., Cacciapuoti, M., Parodi, A., and Rehora, A. (2002). Pemphigus Following Tetanus and Diphtheria Vaccination. *Br. J. Dermatol.* 147, 180–195. doi:10.1046/j.1365-2133.2002.47958.x
- Cozzani, E., Christana, K., Mastrogiacomo, A., Rampini, P., Drosera, M., Casu, M., et al. (2007). Pemphigus Vegetans Neumann Type with Anti-desmoglein and Anti-periplakin Autoantibodies. *Eur. J. Dermatol.* 17, 530–533. doi:10.1684/ejd.2007.0270
- Craft, J. E. (2012). Follicular Helper T Cells in Immunity and Systemic Autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 337–347. doi:10.1038/nrheum.2012.58

- Cremniter, D., Baudin, M., Roujeau, J. C., Prost, C., Consoli, S. G., François, C., et al. (1998). Stressful Life Events as Potential Triggers of Pemphigus. *Arch Dermatol* 134, 1486–1487. doi:10.1001/archderm.134.11.1486
- Cuellar, I., Mejia, M., Castellanos-Angarita, A., and Casas-Barrera, M. A. (2020). Hallopeau Type of Pemphigus Vegetans, an Unusual Clinical Presentation of an Infrequent Disease. *Dermatol Online J* 26, 13030/qt91q8q1fl. doi:10.5070/d32610050470
- Culton, D. A., Qian, Y., Li, N., Rubenstein, D., Aoki, V., Filho, G. H., et al. (2008). Advances in Pemphigus and its Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) Phenotype: a Paradigm of Human Autoimmunity. *J. Autoimmun* 31, 311–324. doi:10.1016/j.jaut.2008.08.003
- Dalla-Costa, R., Pincerañ, M. R., Beltrame, M. H., Malheiros, D., and Petzl-Erler, M. I. (2010). Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 Chromosome Regions Including T-Cell Coreceptor and Ligand Genes May Influence Susceptibility to Pemphigus Foliaceus. *Hum. Immunol.* 71, 809–817. doi:10.1016/j.humimm.2010.04.001
- Damiani, G., Pacifico, A., Pelloni, F., and Iorizzo, M. (2021). 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.* 35, e645–e647. doi:10.1111/jdv.17472
- Daneshpazhooh, M., Chams-Davatchi, C., Khamesipour, A., Mansoori, P., Taheri, A., Firooz, A., et al. (2007). Desmoglein 1 and 3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Iranian Patients with Pemphigus Vulgaris: Correlation with Phenotype, Severity, and Disease Activity. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol* 21, 1319–1324. doi:10.1111/j.1468-3083.2007.02254.x
- Daneshpazhooh, M., Fatehnejad, M., Rahbar, Z., Balighi, K., Ghandi, N., Ghiasi, M., et al. (2016). Trauma-induced Pemphigus: a Case Series of 36 Patients. *JDDG: J. der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 14, 166–171. doi:10.1111/ddg.12738
- Dar, S. A., Akhter, N., Haque, S., Singh, T., Mandal, R. K., Ramachandran, V. G., et al. (2016). Tumor Necrosis Factor (TNF)- α -308G/A (Rs1800629) Polymorphism Distribution in North India and its Association with Pemphigus: Case-Control Study and Meta-Analysis. *Autoimmunity* 49, 179–187. doi:10.3109/08916934.2015.1134512
- Das, D., Singh, A., Antil, P. S., Sharma, D., Arava, S., Khandpur, S., et al. (2020). Distorted Frequency of Dendritic Cells and Their Associated Stimulatory and Inhibitory Markers Augment the Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Immunol. Res.* 68, 353–362. doi:10.1007/s12026-020-09166-0
- Davies, A., Merli, F., Mihaljević, B., Mercadal, S., Sirtanaratkul, N., Solà-Cèligny, P., et al. (2017). Efficacy and Safety of Subcutaneous Rituximab versus Intravenous Rituximab for First-Line Treatment of Follicular Lymphoma (SABRINA): a Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Haematol* 4, e272–e282. doi:10.1016/S2352-3026(17)30078-9
- De Bonis, M., De Paolis, E., Scaglione, G. L., Fania, L., Lavieri, M. M., Mazzanti, C., et al. (2019). High-resolution Melting Analysis to Screen the ST18 Gene Functional Risk Variant for Pemphigus Vulgaris: The Occasion to Open a Debate on its Usefulness in Clinical Setting. *Exp. Mol. Pathol* 108, 57–63. doi:10.1016/j.yemp.2019.03.009
- De, D., Kumar, S., Handa, S., and Mahajan, R. (2019). Fingernail Involvement in Pemphigus and its Correlation with Disease Severity and Other Clinicodemographic Parameters. *Br. J. Dermatol.* 180, 662–663. doi:10.1111/bjd.17136
- De Simone, C., Caldarella, G., D'agostino, M., Zampetti, A., Amerio, P., and Feliciani, C. (2008). Exacerbation of Pemphigus after Influenza Vaccination. *Clin. Exp. Dermatol* 33, 718–720. doi:10.1111/j.1365-2230.2008.02835.x
- Del Fresno, C., Saz-Leal, P., Enamorado, M., Wculek, S. K., Martínez-Cano, S., Blanco-Méndez, N., et al. (2018). DNGR-1 in Dendritic Cells Limits Tissue Damage by Dampening Neutrophil Recruitment. *Science* 362, 351–356. doi:10.1126/science.aan8423
- Delgado, J. C., Yunis, D. E., Bozón, M. V., Salazar, M., Denlofeut, R., Turbay, D., et al. (1996). MHC Class II Alleles and Haplotypes in Patients with Pemphigus Vulgaris from India. *Tissue Antigens* 48, 668–672. doi:10.1111/j.1399-0039.1996.tb02690.x
- Delgado-Rizo, V., Martínez-Guzmán, M. A., Iñiguez-Gutiérrez, L., García-Oroco, A., Alvarado-Navarro, A., and Pafitis-Morris, M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps and its Implications in Inflammation: An Overview. *Front. Immunol* 8, 81. doi:10.3389/fimmu.2017.00081
- Dey-Rao, R., Seiffert-Sinha, K., and Sinha, A. A. (2013). Genome-wide Expression Analysis Suggests Unique Disease-Promoting and Disease-Preventing Signatures in Pemphigus Vulgaris. *Genes Immun.* 14, 487–499. doi:10.1038/gene.2013.44
- Di Zenzo, G., Di Lullo, G., Corti, D., Calabresi, V., Sinistro, A., Vanzetta, F., et al. (2012). Pemphigus Autoantibodies Generated through Somatic Mutations Target the Desmoglein-3 Gs-Interface. *J. Clin. Invest.* 122, 3781–3790. doi:10.1172/JCI64413
- Diaz, L. A., Sampaio, S. A. P., Rivitti, E. A., Martins, C. R., Cunha, P. R., Lombardi, C., et al. (1989). Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and Historic Epidemiologic Studies. *J. Invest. Dermatol.* 92, 4–12. doi:10.1111/1523-1747.ep13070394
- Didona, D., Maglie, R., Erming, R., and Hertl, M. (2019). Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies. *Front Immunol* 10, 1418. doi:10.3389/fimmu.2019.01418
- Dmochowski, M., Hashimoto, T., and Nishikawa, T. (1992). The Analysis of IgG Subclasses of Anti-intercellular Antibodies in Pemphigus by an Immunoblot Technique. *Arch Dermatol Res.* 284, 309–311. doi:10.1007/bf00372587
- Dmochowski, M., Hashimoto, T., Garrod, D. R., and Nishikawa, T. (1993). Desmocollins I and II Are Recognized by Certain Sera from Patients with Various Types of Pemphigus, Particularly Brazilian Pemphigus Foliaceus. *J. Invest. Dermatol.* 100, 380–384. doi:10.1111/1523-1747.ep12471934
- Dress, R. J., Duterte, C.-A., Giladi, A., Schlitzer, A., Low, I., Shadan, N. B., et al. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells Develop from Iy6D+ Lymphoid Progenitors Distinct from the Myeloid Lineage. *Nat Immunol.* 20, 852–864. doi:10.1038/s41590-019-0420-3
- Eberhard, Y., Burgos, E., Gagliardi, J., Vullo, C. M., Borosky, A., Pesoa, S., et al. (2005). Cytokine Polymorphisms in Patients with Pemphigus. *Arch. Dermatol Res.* 296, 309–313. doi:10.1007/s00403-004-0528-6
- Ellébrecht, C. T., Choi, E. J., Allman, D. M., Tsai, D. E., Wegener, W. A., Goldenberg, D. M., et al. (2014). Subcutaneous Vedolizumab, a Humanized Anti-CD20 Antibody, in the Treatment of Refractory Pemphigus Vulgaris. *JAMA Dermatol.* 150, 1331. doi:10.1001/jamadermatol.2014.1939
- Ellébrecht, C. T., Bhoj, V. G., Nace, A., Choi, E. J., Mao, X., Cho, M. J., et al. (2016). Reengineering Chimeric Antigen Receptor T Cells for Targeted Therapy of Autoimmune Disease. *Science* 353, 179–184. doi:10.1126/science.1256756
- Erming, R., and Hertl, M. (2006). Immunoadsorption in Pemphigus. *Autoimmunity* 39, 609–616. doi:10.1080/08916930600972040
- Erming, R., Büdinger, L., Riechers, R., Christensen, O., Bohlen, H., Kalish, R., et al. (2000). Frequency Analysis of Autoreactive T-helper 1 and 2 Cells in Bullous Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Br. J. Dermatol.* 143, 1279–1282. doi:10.1046/j.1365-2133.2000.03901.x
- Erming, R., Hennerici, T., Bäcklund, J., Feliciani, C., Visconti, K. C., Willenborg, S., et al. (2014). Pathogenic IgG Antibodies against Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris Are Regulated by HLA-DRb1*04:02-Restricted T Cells. *J. I.* 193, 4391–4399. doi:10.4049/jimmunol.1401081
- Etesami, L., Seirafi, H., Ghandi, N., Salmani, H., Arabpour, M., Nasrollahzadeh, A., et al. (2018). The Association between ST 18 Gene Polymorphism and Severe Pemphigus Disease Among Iranian Population. *Exp. Dermatol.* 27, 1395–1398. doi:10.1111/exd.13778
- Evangelista, F., Dasher, D. A., Diaz, L. A., Prisyankh, P. S., and Li, N. (2008). E-cadherin Is an Additional Immunological Target for Pemphigus Autoantibodies. *J. Invest Dermatol.* 128, 1710–1718. doi:10.1038/sj.jid.5701260
- Eyre, R. W., and Stanley, J. R. (1987). Human Autoantibodies against a Desmosomal Protein Complex with a Calcium-Sensitive Epitope Are Characteristic of Pemphigus Foliaceus Patients. *J. Exp. Med.* 165, 1719–1724. doi:10.1084/jem.165.6.1719
- Eyre, R. W., and Stanley, J. R. (1988). Identification of Pemphigus Vulgaris Antigen Extracted from normal Human Epidermis and Comparison with Pemphigus Foliaceus Antigen. *J. Clin. Invest.* 81, 807–812. doi:10.1172/JCI113387
- Fenner, J., Min, M. S., Liu, S., and Silverberg, N. (2020). A Case of Neonatal Pemphigus Vulgaris with Co-existing BP180 Autoantibodies. *Pediatr. Dermatol.* 37, 241–243. doi:10.1111/pde.14059
- Fenniche, S., Benmously, R., Marrak, H., Dhaoui, A., Ammar, F. B., and Mokhtar, I. (2006). Neonatal Pemphigus Vulgaris in an Infant Born to a Mother with Pemphigus Vulgaris in Remission. *Pediatr. Dermatol.* 23, 124–127. doi:10.1111/j.1525-1470.2006.00195.x

- Hübiger, E., Hammerschmid, F., Stöckl, G., and Maurer, D. (1998). Anti-PepsilonR1alpha Autoantibodies in Autoimmune-Mediated Disorders. Identification of a Structure-Function Relationship. *J. Clin. Invest.* 101, 243–251. doi:10.1172/JCI511
- Hübner, E., Harper, E., Skorcheva, I., Kurtz, S. E., and Blauvelt, A. (2007). Pathophysiology of Psoriasis: Recent Advances on IL-23 and Th17 Cytokines. *Curr. Rheumatol. Rep.* 9, 461–467. doi:10.1007/s11926-007-0075-1
- Focosi, D., Tuccori, M., and Maggi, F. (2019). Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and anti-CD20 Monoclonal Antibodies: What Do We Know after 20 Years of Rituximab. *Rev. Med. Virol.* 29. doi:10.1002/rmv.2077
- Foster, M. L., Spaulding, R. T., and Schadt, C. R. (2021). Neonatal Pemphigus Vulgaris. *JAMA Dermatol.* 157, 220. doi:10.1001/jamadermatol.2020.3990
- Fruščić-zločin, M., Pergament, R., Michel, B., David, M., Mimouni, D., Brégère, F., et al. (2005). The Interaction of Pemphigus Autoimmunoglobulins with Epidermal Cells: Activation of the Fas Apoptotic Pathway and the Use of Caspase Activity for Pathogenicity Tests of Pemphigus Patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1050, 371–379. doi:10.1196/annals.1313.040
- Fryer, E. J., and Leibold, M. (1994). Pemphigus Vulgaris after Initiation of Psoralen and UVA Therapy for Psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 30, 651–653. doi:10.1016/S0190-9622(09)80116-3
- Futai, Y., Amagai, M., Sekiguchi, M., Nishifuji, K., Fujii, Y., and Nishikawa, T. (2000). Use of Domain-Swapped Molecules for Conformational Epitope Mapping of Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 115, 829–834. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00137.x
- Gabrilovich, D. L., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174. doi:10.1038/nri2506
- Gambino, A., Carbone, M., Arduino, P. G., Garcieri, P., Carbone, L., and Brocchetti, R. (2014). Conservative Approach in Patients with Pemphigus Gingival Vulgaris: A Pilot Study of Five Cases. *Int. J. Dentistry* 2014, 1–4. doi:10.1155/2014/747506
- Gamonet, C., Ferrand, C., Colliou, N., Musette, P., Joly, P., Girardin, M., et al. (2014). Lack of Expression of an Alternative CD20 Transcript Variant in Circulating B Cells from Patients with Pemphigus. *Exp. Dermatol.* 23, 66–67. doi:10.1111/exd.12299
- Gao, J., Zhu, C., Zhang, Y., Sheng, Y., Yang, F., Wang, W., et al. (2018). Association Study and Fine-Mapping Major Histocompatibility Complex Analysis of Pemphigus Vulgaris in a Han Chinese Population. *J. Invest. Dermatol.* 138, 2307–2314. doi:10.1016/j.jid.2018.05.011
- Gazit, E., and Loewenthal, R. (2005). The Immunogenetics of Pemphigus Vulgaris. *Autoimmun. Rev.* 4, 16–20. doi:10.1016/j.autrev.2004.05.002
- Geller, S., Gat, A., Zedi, T., Hafner, A., Eming, R., Herd, M., et al. (2014). The Expanding Spectrum of IgA Pemphigus: a Case Report and Review of the Literature. *Br. J. Dermatol.* 171, 650–656. doi:10.1111/bjd.12940
- Geng, L., Wang, Y., Zhai, N., Lu, Y. N., Song, F. J., and Chen, H. D. (2005). Association between Pemphigus Vulgaris and Human Leukocyte Antigen in Han Nation of Northeast China. *Chin. Med. Sci. J.* 20, 166–170.
- Ghaedi, F., Etesami, L., Aryanian, Z., Kalantari, Y., Goodarzi, A., Teymourpour, A., et al. (2021). Drug-induced Pemphigus: A Systematic Review of 170 Patients. *Int. Immunopharmacology* 92, 107299. doi:10.1016/j.intimp.2020.107299
- Goebeler, M., Batu-Csörgő, Z., De Simone, C., Didona, B., Remenyik, E., Reznichenko, N., et al. (2021). Treatment of Pemphigus Vulgaris and Folliculitis with Efgartigimod, a Neonatal Fc Receptor Inhibitor: a Phase II Multicentre, Open-label Feasibility Trial. *Br. J. Dermatol.* 20782. doi:10.1111/bjd.20782
- Goh, M. S. Y., McCormack, C., Dinh, H. V., Walsh, B., Foley, P., and Prince, H. M. (2007). Rituximab in the Adjuvant Treatment of Pemphigus Vulgaris: a Prospective Open-Label Pilot Study in Five Patients. *Br. J. Dermatol.* 156, 990–996. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07800.x
- Gonçalves, G. A., Brito, M. M., Salathiel, A. M., Ferraz, T. S., Alves, D., and Roselino, A. M. (2011). Incidence of Pemphigus Vulgaris Exceeds that of Pemphigus Foliaceus in a Region where Pemphigus Foliaceus Is Endemic: Analysis of a 21-year Historical Series. *Bras. Dermatol.* 86, 1109–1112. doi:10.1590/s0365-05962011000600007
- Gophtu, C., and Staughton, R. C. D. (1998). Use of Topical Cyclosporin in Oral Pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 38, 860–861. doi:10.1016/S0190-9622(98)70476-1
- Grando, S. A., and Dahl, M. V. (2000). Nicotine and Pemphigus. *Arch. Dermatol.* 136, 1269. doi:10.1001/archderm.136.10.1269
- Grando, S. A. (2000). Autoimmunity to Keratinocyte Acetylcholine Receptors in Pemphigus. *Dermatology* 201, 290–295. doi:10.1159/000051540
- Grando, S. A. (2019). Retrospective Analysis of a Single-center Clinical Experience toward Development of Curative Treatment of 123 Pemphigus Patients with a Long-term Follow-up: Efficacy and Safety of the Multidrug Protocol Combining Intravenous Immunoglobulin with the Cytotoxic Immunosuppressor and Mitochondrion-protecting Drugs. *Int. J. Dermatol.* 58, 114–125. doi:10.1111/ijd.14143
- Green, M. G., and Bystryn, J.-C. (2008). Effect of Intravenous Immunoglobulin Therapy on Serum Levels of IgG1 and IgG4 Antidesmoglein 1 and Antidesmoglein 3 Antibodies in Pemphigus Vulgaris. *Arch. Dermatol.* 144, 1621–1624. doi:10.1001/archdermatol.2008.503
- Grillo-López, A. J. (2000). Rituximab: an Insider's Historical Perspective. *Semin. Oncol.* 27 (6 Suppl 12), 9–16.
- Gürcan, H. M., and Razaque Ahmed, A. (2009). Analysis of Current Data on the Use of Methotrexate in the Treatment of Pemphigus and Pemphigoid. *Br. J. Dermatol.* 161, 723–731. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09246.x
- Gushi, M., Yamamoto, Y.-I., Mine, Y., Awazawa, R., Nonaka, K., Taira, K., et al. (2008). Neonatal Pemphigus Vulgaris. *J. Dermatol.* 35, 529–535. doi:10.1111/j.1346-8138.2008.00515.x
- Hamadah, I., Chisti, M. A., Haider, M., Binamer, Y., Alajlan, S., Aleyouni, Y., et al. (2019). Rituximab/IVIg in Pemphigus - a 10-year Study with a Long Follow-Up. *J. Dermatol. Treat.* 30, 170–175. doi:10.1080/09546634.2018.1484873
- Hammers, C. M., and Stanley, J. R. (2016). Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 11, 175–197. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044313
- Hammers, C. M., Chen, J., Lin, C., Kacir, S., Siegel, D. L., Payne, A. S., et al. (2015). Persistence of Anti-desmoglein 3 IgG + B-Cell Clones in Pemphigus Patients over Years. *J. Invest. Dermatol.* 135, 742–749. doi:10.1038/ijd.2014.291
- Harman, K. E., Brown, D., Exton, L. S., Groves, R. W., Hampton, P. J., Mohd Mustapa, M. F., et al. (2017). British Association of Dermatologists' Guidelines for the Management of Pemphigus Vulgaris 2017. *Br. J. Dermatol.* 177, 1170–1201. doi:10.1111/bjd.15930
- Hashimoto, K., Miki, Y., Nakata, S., and Matsuyama, M. (1977). HLA-A10 in Pemphigus Among Japanese. *Arch. Dermatol.* 113, 1518–1519. doi:10.1001/archderm.1977.01640110038003
- Hashimoto, T., Sugjura, M., Kurihara, S., and Nishikawa, T. (1983). Atypical Pemphigus Showing Eosinophilic Spongiosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 8, 37–40. doi:10.1111/j.1365-2230.1983.tb01742.x
- Hashimoto, K., Singer, K., and Lazarus, G. S. (1984). Penicillamine-Induced Pemphigus. *Arch. Dermatol.* 120, 762–764. doi:10.1001/archderm.1984.01650420072019
- Hashimoto, K., Wun, T.-C., Baird, J., Lazarus, G. S., and Jensen, P. J. (1989). Characterization of Keratinocyte Plasminogen Activator Inhibitors and Demonstration of the Prevention of Pemphigus IgG-Induced Acantholysis by a Purified Plasminogen Activator Inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 92, 310–314. doi:10.1111/1523-1747.ep12277087
- Hashimoto, T., Ogawa, M. M., Konohana, A., and Nishikawa, T. (1990). Detection of Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus Antigens by Immunoblot Analysis Using Different Antigen Sources. *J. Invest. Dermatol.* 94, 327–331. doi:10.1111/1523-1747.ep12874456
- Hashimoto, K., Hashimoto, T., Higashiyama, M., Nishikawa, T., Garrod, D., and Yoshikawa, K. (1994). Detection of Anti-desmoglein I and II Autoantibodies in Two Cases of Hallopeau Type Pemphigus Vegetans by Immunoblot Analysis. *J. Dermatol. Sci.* 7, 100–106. doi:10.1016/0923-1811(94)90083-3
- Hashimoto, T., Amagai, M., Watanabe, K., Chorzecki, T. P., Bhogal, B. S., Black, M. M., et al. (1995). Characterization of Paraneoplastic Pemphigus Autoantigens by Immunoblot Analysis. *J. Invest. Dermatol.* 104, 829–834. doi:10.1111/1523-1747.ep12607012
- Hashimoto, T., Kiyokawa, C., Mori, O., Miyasato, M., Chidgey, M. A. J., Garrod, D. R., et al. (1997). Human Desmocollin 1 (Dsc1) Is an Autoantigen for the Subcorneal Pustular Dermatitis Type of IgA Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 109, 127–131. doi:10.1111/1523-1747.ep12319025
- Hébert, V., Petit, M., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Riou, G., Derambure, C., et al. (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
- Hébert, V., Vermeulin, T., Tanguy, L., Tedbird, B., Mignard, C., Bénichou, J., et al. (2020). Comparison of Real Costs in the French Healthcare System in Newly Diagnosed Patients with Pemphigus for First-line Treatment with Rituximab vs. Standard Corticosteroid Regimen: Data from a National Multicentre Trial. *Br. J. Dermatol.* 183, 121–127. doi:10.1111/bjd.18563
- Hébert, V., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Petit, M., Riou, G., Boyer, O., et al. (2021). Modifications of the BAF/BAFF-Receptor Axis in Patients with Pemphigus Treated with Rituximab versus Standard Corticosteroid Regimen. *Front. Immunol.* 12, 666022. doi:10.3389/fimmu.2021.666022
- Heizmann, M., Išin, P., Wernli, M., Borradori, L., and Bargetzi, M. J. (2001). Successful Treatment of Paraneoplastic Pemphigus in Follicular NHL with Rituximab: Report of a Case and Review of Treatment for Paraneoplastic Pemphigus in NHL and CLL. *Am. J. Hematol.* 66, 142–144. doi:10.1002/1096-8652(200102)66:2<142::AID-AJH1032>3.0.CO;2-0
- Hennerici, T., Pollmann, R., Schmidt, T., Seipelt, M., Tackenberg, B., Möbs, C., et al. (2016). Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. *PLoS ONE* 11, e0148919. doi:10.1371/journal.pone.0148919
- Hertl, M., Jedlickova, H., Karpati, S., Marinovic, B., Uzun, S., Yayli, S., et al. (2015). Pemphigus. S2 Guideline for Diagnosis and Treatment - Guided by the European Dermatology Forum (EDF) in Cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 29, 405–414. doi:10.1111/jdv.12772
- Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., and Waschke, J. (2008). Pemphigus Vulgaris IgG Directly Inhibit Desmoglein 3-mediated Transinteraction. *J. Immunol.* 181, 1825–1834. doi:10.4049/jimmunol.181.3.1825
- Ho, A. W., and Kupper, T. S. (2019). T Cells and the Skin: from Protective Immunity to Inflammatory Skin Disorders. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 490–502. doi:10.1038/s41577-019-0162-3
- Hobbs, I. K., Noland, M. M. B., Raghavan, S. S., and Gru, A. A. (2021). Pemphigus Erythematosis: A Case Series from a Tertiary Academic center and Literature Review. *J. Cutan. Pathol.* 48, 1038–1050. doi:10.1111/cup.13992
- Hodgson, T. A., Malik, F., Hegarty, A. M., and Porter, S. R. (2003). Topical Tacrolimus: a Novel Therapeutic Intervention for Recalcitrant Labial Pemphigus Vulgaris. *Eur. J. Dermatol.* 13, 142–144.
- Holstein, J., Solimari, F., Baum, C., Meier, K., Pollmann, R., Didona, D., et al. (2021). Immunophenotyping in Pemphigus Reveals a TH17/TFH17 Cell-Dominated Immune Response Promoting Desmoglein 3-specific Autoantibody Production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147, 2358–2369. doi:10.1016/j.jaci.2020.11.008
- Horwitz, M. S., and Sarvetnick, N. (1999). Virus, Host Responses, and Autoimmunity. *Immunol. Rev.* 169, 241–253. doi:10.1111/j.1600-065X.1999.tb01319.x
- Howard, J. P., Brill, V., Vu, T., Karam, C., Peric, S., Margania, T., et al. (2021). Safety, Efficacy, and Tolerability of Efgartigimod in Patients with Generalised Myasthenia Gravis (ADAPT): a Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Neurol.* 20, 526–536. doi:10.1016/S1474-4422(21)00159-9
- Hsu, D. Y., Brieva, J., Sinha, A. A., Langan, S. M., and Silverberg, J. I. (2016). Comorbidities and Inpatient Mortality for Pemphigus in the U.S.A. *Br. J. Dermatol.* 174, 1290–1298. doi:10.1111/bjd.14463
- Huang, Y.-H., Wang, S.-H., Kuo, T.-T., and Chi, C.-C. (2005). Pemphigus Vegetans Occurring in a Split-Thickness Skin Graft. *Dermatol. Surg.* 31, 240–243. doi:10.1097/D00042728-200502000-00023
- Hübner, P., Recke, A., Zillikens, D., Linder, R., and Schmidt, E. (2016). Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany. *J. Invest. Dermatol.* 136, 2495–2498. doi:10.1016/j.jid.2016.07.013
- Imchen, S., Jain, V., and Jindal, N. (2014). Localized Pemphigus Vegetans without Mucosal Involvement. *Indian J. Dermatol.* 59, 210. doi:10.4103/0019-5154.127712
- Inaoki, M., Koda, M., Fujimoto, A., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., and Takehara, K. (2001). Paraneoplastic Pemphigus without Antidesmoglein 3 or Antidesmoglein 1 Autoantibodies. *Br. J. Dermatol.* 144, 610–613. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04095.x
- Ishii, M., Izumi, J., Fujiwara, H., Ito, M., and Hamada, M. (2001). Immunoblotting Detection of Gamma-Catenin (Plakoglobin) Antibody in the Serum of a Patient with Paraneoplastic Pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 144, 377–379. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04031.x
- Ishii, K., Lin, C., Siegel, D. L., and Stanley, J. R. (2008). Isolation of Pathogenic Monoclonal Anti-desmoglein 1 Human Antibodies by Phage Display of Pemphigus Foliaceus Autoantibodies. *J. Invest. Dermatol.* 128, 939–948. doi:10.1038/sj.jid.5701132
- Ishii, N., Teye, K., Fukuda, S., Uehara, R., Hachiya, T., Koga, H., et al. (2015). Anti-desmoglein Autoantibodies in Nonclassical Pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 173, 59–68. doi:10.1111/bjd.13711
- Jablonska, S., Chorzeński, T. P., Beutner, E. H., and Chorzeńska, J. (1975). Herpetiform Pemphigus, a Variable Pattern of Pemphigus. *Int. J. Dermatol.* 14, 353–359. doi:10.1111/j.1365-4362.1975.tb00125.x
- Jain, V. K., Dixit, V. B., and Mohan, H. (1989). Pemphigus Vegetans in an Unusual Site. *Int. J. Dermatol.* 28, 352–353. doi:10.1111/j.1365-4362.1989.tb01365.x
- Janda, B., Patel, A. A., Lau, M. C., Goh, C. C., Msallam, R., Kong, W. T., et al. (2019). A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGFA-Mediated Recruitment of Neutrophils. *Immunity* 50, 1069–1083. e8. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.001
- Jelti, L., Cordel, N., Gillibert, A., Lacour, J.-P., Uthuriague, C., Doutre, M.-S., et al. (2019). Incidence and Mortality of Pemphigus in France. *J. Invest. Dermatol.* 139, 469–473. doi:10.1016/j.jid.2018.07.042
- Jennings, J. M., Tucker, D. K., Kotke, M. D., Saito, M., Delva, E., Hanakawa, Y., et al. (2011). Desmosome Disassembly in Response to Pemphigus Vulgaris IgG Occurs in Distinct Phases and Can Be Reversed by Expression of Exogenous Dsg3. *J. Invest. Dermatol.* 131, 706–718. doi:10.1038/jid.2010.389
- Jmaa, M. B., Abida, O., Fakhfakh, R., Bahloul, E., Sélami, K., Gaddour, L., et al. (2018/2018). Involvement of the IL23/Th17 Pathway in the Pathogenesis of Tunisian Pemphigus Foliaceus. *Mediators Inflamm.* 2018, 1–12. doi:10.1155/2018/8206983
- Jolles, S. (2001). A Review of High-Dose Intravenous Immunoglobulin (hIVIg) in the Treatment of the Autoimmune Blistering Disorders. *Clin. Exp. Dermatol.* 26, 127–131. doi:10.1046/j.1365-2230.2001.00779.x
- Joly, P., and Litrowski, N. (2011). Pemphigus Group (Vulgaris, Vegetans, Foliaceus, Herpetiformis, Brasiliensis). *Clin. Dermatol.* 29, 432–436. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.01.013
- Joly, P., Richard, C., Gilbert, D., Courville, P., Chosidow, O., Roujeau, J. C., et al. (2000). Sensitivity and Specificity of Clinical, Histologic, and Immunologic Features in the Diagnosis of Paraneoplastic Pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, 619–626. doi:10.1067/mjd.2000.107488
- Joly, P., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hébert, V., Houivet, E., Calbo, S., et al. (2017). First-line Rituximab Combined with Short-Term Prednisone versus Prednisone Alone for the Treatment of Pemphigus (Ritux 3): a Prospective, Multicentre, Parallel-Group, Open-Label Randomised Trial. *The Lancet* 389, 2031–2040. doi:10.1016/S0140-6736(17)30070-3
- Joly, P., Horvath, B., Patsatsi, A., Umri, S., Bech, R., Beissert, S., et al. (2020). Updated SZK Guidelines on the Management of Pemphigus Vulgaris and Foliaceus Initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 34, 1900–1913. doi:10.1111/jdv.16752
- Kaegi, C., Steiner, U. C., Wuest, B., Crowley, C., and Boyman, O. (2020). Systematic Review of Safety and Efficacy of Ataccept in Treating Immune-Mediated Disorders. *Front. Immunol.* 11, 433. doi:10.3389/fimmu.2020.00433
- Kalantari-Dehaghi, M., Anhalt, G. J., Camilleri, M. J., Chernyavsky, A. L., Chun, S., Felgner, P. L., et al. (2013). Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. *PLoS ONE* 8, e57587. doi:10.1371/journal.pone.0057587
- Kamiya, K., Aoyama, Y., Shirafuji, Y., Hamada, T., Morizane, S., Fujii, K., et al. (2012). Detection of Antibodies against the Non-calcium-dependent Epitopes of Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris and Their Pathogenic Significance. *Br. J. Dermatol.* 167, 252–261. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10929.x
- Kamiya, K., Aoyama, Y., Shirafuji, Y., Hamada, T., Morizane, S., Fujii, K., et al. (2013). A Higher Correlation of the Antibody Activities against the Calcium-dependent Epitopes of Desmoglein 3 Quantified by Ethylenediaminetetraacetic Acid-Treated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Clinical Disease Activities of Pemphigus Vulgaris. *J. Dermatol. Sci.* 70, 190–195. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.02.011
- Kamran, B., Maryam, D., Somayeh, K., Mostafa, M.-n., Mahsa, H.-j., and Cheyda, C.-D. (2013). Adjuvant Rituximab in the Treatment of Pemphigus Vulgaris: a Phase II Clinical Trial. *Int. J. Dermatol.* 52, 862–867. doi:10.1111/j.1365-4632.2012.5847.x

- Kano, Y., Shimosegawa, M., Mizukawa, Y., and Shiohara, T. (2000). Pemphigus Foliaceus Induced by Exposure to Sunlight. *Dermatology* 201, 132–138. doi:10.1159/000018456
- Kanwar, A. J., and Kaur, S. (1991). Pemphigus in Children. *Int. J. Dermatol.* 30, 343–346. doi:10.1111/j.1365-4362.1991.tb03872.x
- Kardos, M., Levine, D., Gürcan, H. M., and Ahmed, A. R. (2009). Pemphigus Vulgaris in Pregnancy. *Obstetrical Gynecol. Surv.* 64, 739–749. doi:10.1097/OGX.0b013e3181ba089
- Kárpáti, S., Amagai, M., Liu, W. L., Dmochowski, M., Hashimoto, T., and Horváth, A. (2000). Identification of Desmoglein 1 as Autoantigen in a Patient with Intraepidermal Neutrophilic IgA Dermatitis Type of IgA Pemphigus. *Exp. Dermatol.* 9, 224–228. doi:10.1034/j.1600-0625.2000.009003224.x
- Kasperkiewicz, M., Kowalewski, C., and Jabłońska, S. (2014). Pemphigus Herpetiformis: From First Description until Now. *J. Am. Acad. Dermatol.* 70, 780–787. doi:10.1016/j.jaad.2013.11.043
- Kasperkiewicz, M., Blebret, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S., et al. (2017). Pemphigus. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17026. doi:10.1038/nrdp.2017.26
- Kawasaki, Y., Aoyama, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., and Kitajima, Y. (2006). Pathogenic Monoclonal Antibody against Desmoglein 3 Augments Desmoglein 3 and p38 MAPK Phosphorylation in Human Squamous Carcinoma Cell Line. *Autoimmunity* 39, 587–590. doi:10.1080/08916930600971943
- Kazerounian, S., Mahoney, M. G., Utito, J., and Aho, S. (2000). Envoplakin and Periplakin, the Paraneoplastic Pemphigus Antigens, Are Also Recognized by Pemphigus Foliaceus Autoantibodies. *J. Invest. Dermatol.* 115, 505–507. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00088.2.x
- Khachemoune, A., Guldbacke, K. K., and Ehrsam, E. (2006). Pemphigus Foliaceus: a Case Report and Short Review. *Cutis* 78 (2), 105–110.
- Kim, S.-C., Kwon, Y. D., Lee, I. J., Lee, I. J., Chang, S. N., and Lee, T. G. (1997). cDNA Cloning of the 210-kDa Paraneoplastic Pemphigus Antigen Reveals that Envoplakin Is a Component of the Antigen Complex. *J. Invest. Dermatol.* 109, 365–369. doi:10.1111/1523-1747.ep12336235
- Kim, S.-C., Chung, Y. L., Kim, J., Cho, N. J., and Amagai, M. (2001). Pemphigus Vulgaris with Autoantibodies to Desmoplakin. *Br. J. Dermatol.* 145, 838–840. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04415.x
- Kim, A. R., Han, D., Choi, J. Y., Seok, J., Kim, S.-E., Seo, S.-H., et al. (2020). Targeting Inducible Costimulator Expressed on CXCR5+PD-1+ TH Cells Suppresses the Progression of Pemphigus Vulgaris. *J. Allergy Clin. Immunol.* 146, 1070–1079. e8. doi:10.1016/j.jaci.2020.03.036
- Kitashima, D. Y., Kobayashi, T., Woodring, T., Idouchi, K., Doebel, T., Voisin, B., et al. (2018). Langerhans Cells Prevent Autoimmunity via Expansion of Keratinocyte Antigen-specific Regulatory T Cells. *EBioMedicine* 27, 293–303. doi:10.1016/j.ebiom.2017.12.022
- Kljuik, A., Bazzi, H., Sundberg, J. P., Martinez-Mir, A., O'Shaughnessy, R., Mahoney, M. G., et al. (2003). Desmoglein 4 in Hair Follicle Differentiation and Epidermal Adhesion. *Cell* 113, 249–260. doi:10.1016/S0092-8674(03)00273-3
- Kneisel, A., and Hertl, M. (2011a). Autoimmune Bullous Skin Diseases. Part 1: Clinical Manifestations. *JDDG: J. der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 9, 844–857. doi:10.1111/j.1610-0387.2011.07793.x
- Kneisel, A., and Hertl, M. (2011b). Autoimmune Bullous Skin Diseases. Part 2: Diagnosis and Therapy. *JDDG: J. der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 9, 927–947. doi:10.1111/j.1610-0387.2011.07809.x
- Koch, P. J., Mahoney, M. G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Utito, J., Shultz, L., et al. (1997). Targeted Disruption of the Pemphigus Vulgaris Antigen (Desmoglein 3) Gene in Mice Causes Loss of Keratinocyte Cell Adhesion with a Phenotype Similar to Pemphigus Vulgaris. *J. Cell Biol.* 137, 1091–1102. doi:10.1083/jcb.137.5.1091
- Koga, H., Ohyama, B., Tsuruta, D., Ishii, N., Hamada, T., Dainichi, T., et al. (2012). Five Japanese Cases of Antidesmoglein 1 Antibody-positive and Antidesmoglein 3 Antibody-negative Pemphigus with Oral Lesions. *Br. J. Dermatol.* 166, 976–980. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10827.x
- Korman, N. J., Eyre, R. W., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J. R. (1989). Demonstration of an Adhering-Junction Molecule (Plakoglobin) in the Autoantigens of Pemphigus Foliaceus and Pemphigus Vulgaris. *N. Engl. J. Med.* 321, 631–635. doi:10.1056/NEJM198909073211002
- Koufias, I. G., Camara, R., Argyris, P. P., Davis, M. D. P., and Miller, D. D. (2021). Development of Pemphigus Vulgaris after the Second Dose of the mRNA-1273 SARS-Cov-2 Vaccine. *Oral Dis.* doi:10.1111/odi.14089
- Kozłowska, A., Hashimoto, T., Jarzabek-Chorzelska, M., Amagai, A., Nagata, Y., Strasz, Z., et al. (2003). Pemphigus Herpetiformis with IgA and IgG Antibodies to Desmoglein 1 and IgG Antibodies to Desmocollin 3. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48, 117–122. doi:10.1067/mjd.2003.23
- Kridin, K., Zelber-Sagi, S., and Bergman, R. (2017). Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus: Differences in Epidemiology and Mortality. *Acta Derm Venereol* 97, 1095–1099. doi:10.2340/00015555-2706
- Kridin, K., Patel, P. M., Jones, V. A., Cordova, A., and Amber, K. T. (2020). IgA Pemphigus: A Systematic Review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 82, 1386–1392. doi:10.1016/j.jaad.2019.11.059
- Kridin, K. (2018). Pemphigus Group: Overview, Epidemiology, Mortality, and Comorbidities. *Immunol. Res.* 66, 255–270. doi:10.1007/s12026-018-8986-7
- Kushner, C. J., Wang, S., Tovanabutra, N., Tsai, D. E., Werth, V. P., and Payne, A. S. (2019). Factors Associated with Complete Remission after Rituximab Therapy for Pemphigus. *JAMA Dermatol.* 155, 1404. doi:10.1001/jamadermatol.2019.3236
- Lakshmi, M. J. D., Jaisankar, T. J., Rajappa, M., Thappa, D. M., Chandrashekar, L., Divyapriya, D., et al. (2017). Correlation of Antimuscarinic Acetylcholine Receptor Antibody Titers and Antidesmoglein Antibody Titers with the Severity of Disease in Patients with Pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 76, 895–902. doi:10.1016/j.jaad.2016.11.039
- Lambert, J., Bracke, S., Van Roy, F., Pas, H. H., Bonnè, S., and De Schepper, S. (2010). Serum Plakophilin-3 Autoreactivity in Paraneoplastic Pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 163, 630–632. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09845.x
- Langenhan, J., Dworschak, J., Saschenbrecker, S., Komorowski, L., Schlumberger, W., Stöcker, W., et al. (2014). Specific Immunoadsorption of Pathogenic Autoantibodies in Pemphigus Requires the Entire Ectodomains of Desmogleins. *Exp. Dermatol.* 23, 253–259. doi:10.1111/exd.12355
- Lee, C. W., Yang, H. Y., Kim, S.-C., Jung, J. H., and Hwang, J. J. (1998). HLA Class II Allele Associations in Korean Patients with Pemphigus. *Dermatology* 197, 349–352. doi:10.1159/000018030
- Lee, H. E., Berkowitz, P., Jolly, P. S., Diaz, I. A., Chua, M. P., and Rubenstein, D. S. (2009). Biphasic Activation of p38MAPK Suggests that Apoptosis Is a Downstream Event in Pemphigus Acantholysis. *J. Biol. Chem.* 284, 12524–12532. doi:10.1074/jbc.M808204200
- Lee, S. H., Hong, W. J., and Kim, S.-C. (2017). Analysis of Serum Cytokine Profile in Pemphigus. *Ann. Dermatol.* 29, 438. doi:10.5021/ad.2017.29.4.438
- Lee, J., Lundgren, D. K., Mao, X., Manfredo-Vieira, S., Nunez-Cruz, S., Williams, E. F., et al. (2020). Antigen-specific B Cell Depletion for Precision Therapy of Mucosal Pemphigus Vulgaris. *J. Clin. Invest.* 130, 6317–6324. doi:10.1172/JCI138416
- Leger, S., Picard, D., Ingen-Housz-Oro, S., Arnault, J.-P., Aubin, F., Carsuzaa, F., et al. (2012). Prognostic Factors of Paraneoplastic Pemphigus. *Arch. Dermatol.* 148, 1165–1172. doi:10.1001/archdermatol.2012.1830
- Leroy, D., Lebrun, J., Maillard, V., Mandard, J. C., and Deschamps, P. (1982). Pemphigus Vegetans, a Clinical Type of Chronic Pustular Dermatitis of Hallopeau. *Ann. Dermatol. Venerol.* 109, 549–555.
- Li, S., Zhang, Q., Wang, P., Li, J., Ni, J., Wu, J., et al. (2018). Association between HLA-DQB1 Polymorphisms and Pemphigus Vulgaris: A Meta-Analysis. *Immunological Invest.* 47, 101–112. doi:10.1080/08820139.2017.1385622
- Lightman, S. M., Utley, A., and Lee, K. P. (2019). Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Front. Immunol.* 10, 965. doi:10.3389/fimmu.2019.00965
- Lin, M. S., Swartz, S. J., Lopez, A., Ding, X., Fernandez-Vina, M. A., Stastny, P., et al. (1997). Development and Characterization of Desmoglein-3 Specific T Cells from Patients with Pemphigus Vulgaris. *J. Clin. Invest.* 99, 31–40. doi:10.1172/JCI119130
- Liu, Q., Bu, D.-F., Li, D., and Zhu, X.-J. (2008). Genotyping of HLA-I and HLA-II Alleles in Chinese Patients with Paraneoplastic Pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 158, 587–591. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08361.x
- Liu, J., Ge, Y., Zong, L., and Lu, S. (2020). Pemphigus Vegetans Localised to the Soles of Both Feet: Successful Clearance with Intralesional Corticosteroid. *Australas. J. Dermatol.* 61, e452–e453. doi:10.1111/ajd.13355
- Lo, A. S., Mao, X., Mukherjee, E. M., Ellebret, C. T., Yu, X., Posner, M. R., et al. (2016). Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *PLoS ONE* 11, e0156800. doi:10.1371/journal.pone.0156800

- Loiseau, P., Lecleach, L., Prost, C., Lepage, V., Busson, M., Bastuji-Garin, S., et al. (2000). HLA Class II Polymorphism Contributes to Specify Desmoglein Derived Peptides in Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus. *J. Autoimmun.* 15, 67–73. doi:10.1006/jaut.2000.0388
- Lombardi, M. L., de Angelis, E., Rossano, F., and Ruocco, V. (1993). Imbalance between Plasminogen Activator and its Inhibitors in Thiol-Induced Acantholysis. *Dermatology* 186, 118–122. doi:10.1159/000247321
- Lombardi, M. L., Mercurio, O., Pirozzi, G., Manzo, C., Lombardi, V., Ruocco, V., et al. (1999). Common Human Leukocyte Antigen Alleles in Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus Italian Patients. *J. Invest. Dermatol.* 113, 107–110. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00626.x
- Lomda-Nur, F., Miranda, C., and Malikli, R. (1994). Double-blind Clinical Trial of 0.05% Clobetasol Propionate (Corrected from Propionate) Ointment in Orabase and 0.05% Fluocinonide Ointment in Orabase in the Treatment of Patients with Oral Vesiculocerosive Diseases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 77, 598–604. doi:10.1016/0030-4220(94)90318-2
- Lua, A. C. Y., Ong, F. L. L., Choo, K. J. L., Yeo, Y. W., and Oh, C. C. (2021). An Unusual Presentation of Pemphigus Foliaceus Following COVID-19 Vaccination. *Australas. J. Dermatol.* doi:10.1111/ajd.13755
- Lunardon, L., and Payne, A. S. (2012). Inhibitory Human Antichimeric Antibodies to Rituximab in a Patient with Pemphigus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 800–803. doi:10.1016/j.jaci.2012.03.022
- Lund, F. E., and Randall, T. D. (2010). Effector and Regulatory B Cells: Modulators of CD4+ T Cell Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 236–247. doi:10.1038/nri2729
- Mahé, A., Flageul, B., Cissé, I., Kéita, S., and Bobin, P. (1996). Pemphigus in Mali: a Study of 30 Cases. *Br. J. Dermatol.* 134, 114–119.
- Mahoney, M. G., Aho, S., Uitto, J., and Stanley, J. R. (1998). The Members of the Plakin Family of Proteins Recognized by Paraneoplastic Pemphigus Antibodies Include Periplakin. *J. Invest. Dermatol.* 111, 308–313. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00279.x
- Mahoney, M. G., Wang, Z., Rotherberger, K., Koch, P. J., Amagai, M., and Stanley, J. R. (1999). Explanations for the Clinical and Microscopic Localization of Lesions in Pemphigus Foliaceus and Vulgaris. *J. Clin. Invest.* 103, 461–468. doi:10.1172/JCI5252
- Maho-Vaillant, M., Peral, C., Golinski, M.-L., Hébert, V., Caillot, P., Mignard, C., et al. (2021). Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-specific B Cells and Desmoglein-specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 141, 2132–2140. e1. doi:10.1016/j.jid.2021.01.031
- Maier, L., Udvardi, A., Herd, M., Eming, R., Schmidt, E., Zillikens, D., et al. (2017). Paraneoplastic Pemphigus with Anti-bp180 Autoantibodies and Castleman Disease. *Br. J. Dermatol.* 176, 824–826. doi:10.1111/bjd.14877
- Makino, T., Seki, Y., Hara, H., Mizawa, M., Matsui, K., Shimizu, K., et al. (2014). Induction of Skin Lesions by Ultraviolet B Irradiation in a Case of Pemphigus Erythematosus. *Acta Derm Venereol.* 94, 487–488. doi:10.2340/00015555-1781
- Malik, M., and Ahmed, A. R. (2007). Concurrence of Systemic Lupus Erythematosus and Pemphigus: Coincidence or Correlation? *Dermatology* 214, 231–239. doi:10.1159/000099588
- Mao, X., Sano, Y., Park, J. M., and Payne, A. S. (2011). p38 MAPK Activation Is Downstream of the Loss of Intercellular Adhesion in Pemphigus Vulgaris. *J. Biol. Chem.* 286, 1283–1291. doi:10.1074/jbc.M110.172874
- Martel, P., Loiseau, P., Joly, P., Busson, M., Lepage, V., Mouquet, H., et al. (2003). Paraneoplastic Pemphigus Is Associated with the DRB1*03 Allele. *J. Autoimmun.* 20, 91–95. doi:10.1016/s0896-8411(02)0092-6
- Martin, L. K., Werth, V., Villanueva, E., Segall, J., and Murrell, D. F. (2009). Interventions for Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus. *Cochrane Database Syst. Rev.* 21 (1), CD006263. doi:10.1002/14651858.CD006263.pub2
- Mauri, C., and Menon, M. (2017). Human Regulatory B Cells in Health and Disease: Therapeutic Potential. *J. Clin. Invest.* 127, 772–779. doi:10.1172/JCI85113
- Mergler, R., Kerstan, A., Schmidt, E., Goebler, M., and Benoit, S. (2017). Atypical Clinical and Serological Manifestation of Pemphigus Vegetans: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep. Dermatol.* 9, 121–130. doi:10.1159/000468919
- Mignard, C., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Balayé, P., Prost-Squarcioni, C., Houivet, E., et al. (2020). Factors Associated with Short-Term Relapse in Patients with Pemphigus Who Receive Rituximab as First-Line Therapy. *JAMA Dermatol.* 156, 545. doi:10.1001/jamadermatol.2020.0290
- Mignogna, M. D., Muzio, I. L., and Ruocco, E. (2000). Pemphigus Induction by Influenza Vaccination. *Int. J. Dermatol.* 39, 795–800. doi:10.1046/j.1365-4362.2000.00051-5.x
- Mindorf, S., Dettmann, I. M., Krüger, S., Fuhrmann, T., Rentzsch, K., Karl, L., et al. (2017). Routine Detection of Serum Antidesmocollin Autoantibodies Is Only Useful in Patients with Atypical Pemphigus. *Exp. Dermatol.* 26, 1267–1270. doi:10.1111/exd.13409
- Mintz, E. M., and Morel, K. D. (2011). Clinical Features, Diagnosis, and Pathogenesis of Chronic Bullous Disease of Childhood. *Dermatol. Clin.* 29, 459–462. ix. doi:10.1016/j.det.2011.03.022
- Miyagawa, S., Niizeki, H., Yamashina, Y., and Kaneshige, T. (2002). Genotyping for HLA-A, B and C Alleles in Japanese Patients with Pemphigus: Prevalence of Asian Alleles of the HLA-B15 Family. *Br. J. Dermatol.* 146, 52–58. doi:10.1046/j.1365-2133.2002.04564.x
- Möckel, T., Basta, F., Weirmann-Menke, J., and Schwarting, A. (2021). B Cell Activating Factor (BAFF): Structure, Functions, Autoimmunity and Clinical Implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Autoimmun. Rev.* 20, 102736. doi:10.1016/j.autrev.2020.102736
- Mohanty, R., Chowdhury, C., Arega, S., Sen, P., Ganguly, P., and Ganguly, N. (2019). CAR T Cell Therapy: A new era for Cancer Treatment (Review). *Oncol. Rep.* 42, 2183–2195. doi:10.3892/or.2019.7335
- Morell-Dubois, S., Carpentier, O., Cottencin, O., Queyrel, V., Hachulla, E., Hatron, P.-Y., et al. (2008). Stressful Life Events and Pemphigus. *Dermatology* 216, 104–108. doi:10.1159/000111506
- Morini, J. P., Jomaa, B., Gorgi, Y., Saguem, M. H., Nouira, R., Roujeau, J. C., et al. (1993). Pemphigus Foliaceus in Young Women. *Arch. Dermatol.* 129, 69–73. doi:10.1001/archderm.1993.01680220081019
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., et al. (2011). Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity* 34, 108–121. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.012
- Mosaid, Y. M., Fathy, H., Fawzy, Z., and El-Saied, M. A. (2012). Tumor Necrosis Factor- α -308 G>A and Interleukin-6 -174 G>C Promoter Polymorphisms and Pemphigus. *Hum. Immunol.* 73, 560–565. doi:10.1016/j.humimm.2012.02.001
- Mouquet, H., Musette, P., Gougeon, M.-L., Jacquot, S., Lemerrier, B., Lim, A., et al. (2008). B-cell Depletion Immunotherapy in Pemphigus: Effects on Cellular and Humoral Immune Responses. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2859–2869. doi:10.1038/jid.2008.178
- Müller, R., Heber, B., Hashimoto, T., Messer, G., Müllegger, R., Niedermeier, A., et al. (2009). Autoantibodies against Desmocollins in European Patients with Pemphigus. *Clin. Exp. Dermatol.* 34, 898–903. doi:10.1111/j.1365-2230.2009.03241.x
- Müller, R., Hunzelmann, N., Baur, V., Siebenhaar, G., Wenzel, E., Eming, R., et al. (2010). Targeted Immunotherapy with Rituximab Leads to a Transient Alteration of the IgG Autoantibody Profile in Pemphigus Vulgaris. *Dermatol. Res. Pract.* 2010, 1–9. doi:10.1155/2010/321950
- Muramatsu, T., Hida, T., Ko, T., and Shirai, T. (1996). Pemphigus Vulgaris Exacerbated by Exposure to Sunlight. *J. Dermatol.* 23, 559–563. doi:10.1111/j.1346-8138.1996.tb02652.x
- Murrell, D. F., Patsatsi, A., Stavropoulos, P., Baum, S., Zeeli, T., Kern, J. S., et al. (2021). Proof of Concept for the Clinical Effects of Oral Rilzabrutinib, the First Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor for Pemphigus Vulgaris: the Phase II BELIEVE Study*. *Br. J. Dermatol.* 185, 745–755. doi:10.1111/bjd.20431
- Nagaraj, S., Schrum, A. G., Cho, H.-L., Celis, E., and Gabrilovich, D. I. (2010). Mechanism of T Cell Tolerance Induced by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Leuk. Cell Biol.* 184, 3106–3116. doi:10.4049/jimmunol.0902661
- Nagasaka, T., Nishifuji, K., Ota, T., Whittock, N. V., and Amagai, M. (2004). Defining the Pathogenic Involvement of Desmoglein 4 in Pemphigus and Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1484–1492. doi:10.1172/JCI20480
- Neri, D., Carevic-Neri, M., Brück, J., Holstein, J., Schäfer, L., Solimari, F., et al. (2021). Arginase 1 + IL-10 + Polymorphonuclear Myeloid-derived Suppressor Cells Are Elevated in Patients with Active Pemphigus and Correlate with an Increased Th2/Th1 Response. *Exp. Dermatol.* 30, 782–791. doi:10.1111/exd.14298

- Nguyen, V. T., Lee, T. X., Ndoye, A., Shultz, L. D., Pittelkow, M. R., Dahl, M. V., et al. (1998). The Pathophysiological Significance of Nondesmoglein Targets of Pemphigus Autoimmunity. *Arch Dermatol* 134, 971–980. doi:10.1001/archderm.134.8.971
- Nguyen, V. T., Ndoye, A., and Grando, S. A. (2000a). Pemphigus Vulgaris Antibody Identifies Pemphaxin. *J. Biol. Chem.* 275, 29466–29476. doi:10.1074/jbc.M003174200
- Nguyen, V. T., Ndoye, A., Shultz, L. D., Pittelkow, M. R., and Grando, S. A. (2000b). Antibodies against Keratinocyte Antigens Other Than Desmogleins 1 and 3 Can Induce Pemphigus-like Lesions. *J. Clin. Invest* 106, 1467–1479. doi:10.1172/JCI10305
- Nitěki, H., Kumagai, S., Kanagawa, S., Amagai, M., Yamashina, Y., Asada, H., et al. (2004). Exclusion of the TAP1 and TAP2 Genes within the HLA Class II Region as Candidate Susceptibility Genes to Pemphigus in the Japanese Population. *J. Dermatol. Sci.* 36, 122–124. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.08.006
- Nishikawa, T., Hashimoto, T., Teraki, Y., and Ebihara, T. (1991). The Clinical and Histopathological Spectrum of IgA Pemphigus. *Clin. Exp. Dermatol* 16, 401–402. doi:10.1111/j.1365-2230.1991.tb00413.x
- Nooka, A., Shenoy, P. J., Sinha, R., Lonial, S., and Flowers, C. R. (2011). Hepatitis C Reactivation in Patients Who Have Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with Rituximab: A Case Report and Review of Literature. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 11, 379–384. doi:10.1016/j.clml.2011.04.005
- Numata, S., Teye, K., Tsuruta, D., Sogame, R., Ishii, N., Koga, H., et al. (2013). Anti-Alpha-2-Macroglobulin-Like-1 Autoantibodies Are Detected Frequently and May Be Pathogenic in Paraneoplastic Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1785–1793. doi:10.1038/jid.2013.65
- O'Neil, L. J., Kaplan, M. J., and Carmona-Rivera, C. (2019). The Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Vascular Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *JCM* 8, 1325. doi:10.3390/jcm8091325
- Odani, K., Itoh, A., Yanagita, S., Kaneko, Y., Tachibana, M., Hashimoto, T., et al. (2020). Paraneoplastic Pemphigus Involving the Respiratory and Gastrointestinal Mucosae. *Case Rep. Pathol.* 2020, 1–8. doi:10.1155/2020/7350759
- Ohata, C., Higashi, Y., Yamagami, J., Koga, H., Ishii, N., Kanekura, T., et al. (2013). Coexistence of Pemphigus Herpetiformis with IgG Antibodies to Desmocollin 1 and Pemphigoid with IgG Antibodies to BP180 C-Terminal Domain and Laminin γ 2. *JAMA Dermatol* 149, 502–504. doi:10.1001/jamadermatol.2013.1916
- Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J.-i., et al. (2002). Immunologic and Histopathologic Characterization of an Active Disease Mouse Model for Pemphigus Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 118, 199–204. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01643.x
- Ohzono, A., Sogame, R., Li, X., Teye, K., Tsuchisaka, A., Numata, S., et al. (2015). Clinical and Immunological Findings in 104 Cases of Paraneoplastic Pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 173, 1447–1452. doi:10.1111/bjd.14162
- Oktarina, D. A. M., Poot, A. M., Kramer, D., Diercks, G. F. H., Jonkman, M. F., and Pas, H. H. (2012). The IgG 'Lupus-Band' Deposition Pattern of Pemphigus Erythematosus. *Arch Dermatol* 148, 1173. doi:10.1001/archdermatol.2012.1896
- Oktem, A., Hayran, Y., Uysal, P. I., Atlan, A. U., and Yalçın, B. (2018). Evaluation of the Importance of Immunological Profile for Pemphigus Vulgaris in the Light of Necessity to Modify Compensation Theory. *Acta Dermatovenerol Croat* 26, 100–104.
- Oktem, A., Horzum, U., Ertop, P., Kundakci, N., Akay, B. N., Yalcin, B., et al. (2021). Clinical Relevance of Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells in Autoimmune-Blistering Disorders Pemphigus Vulgaris and Bullous Pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* 141, 672–675. e1. doi:10.1016/j.jid.2020.07.015
- Oliveira, M. E. F., Culton, D. A., Prissayanh, P., Qaqish, B. F., and Diaz, I. A. (2013). E-cadherin Autoantibody Profile in Patients with Pemphigus Vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 169, 812–818. doi:10.1111/bjd.12455
- On, H. R., Hashimoto, T., and Kim, S.-C. (2015). Pemphigus Herpetiformis with IgG Autoantibodies to Desmoglein 1 and Desmocollin 1. *Br. J. Dermatol.* 172, 1144–1146. doi:10.1111/bjd.13419
- Ouahes, N., Qureshi, T. A., and Ahmed, A. R. (1997). Infertility in Women with Pemphigus Vulgaris and Other Autoimmune Diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 36, 383–387. doi:10.1016/S0190-9622(97)80213-7
- Paolino, G., Didona, D., Magliulo, G., Iannella, G., Didona, B., Mercuri, S., et al. (2017). Paraneoplastic Pemphigus: Insight into the Autoimmune Pathogenesis, Clinical Features and Therapy. *IJMS* 18, 2532. doi:10.3390/ijms18122532
- Párnická, Z., Švecová, D., Javor, J., Švaňkatová, I., and Buc, M. (2013). High Susceptibility to Pemphigus Vulgaris Due to HLA-Drb1*14:54 in the Slovak Population. *Int. J. Immunogenet.* 40, 471–475. doi:10.1111/iji.12052
- Passicha, J. S., Khaitan, B. K., Raman, R. S., and Chandra, M. (1995). Dexamethasone-Cyclophosphamide Pulse Therapy for Pemphigus. *Int. J. Dermatol.* 34, 875–882. doi:10.1111/j.1365-4362.1995.tb04430.x
- Patullo, V. (2015). Hepatitis B Reactivation in the Setting of Chemotherapy and Immunosuppression - Prevention Is Better Than Cure. *WJH* 7, 954. doi:10.4254/wjh.v7.i7.954
- Payne, A. S., Ishii, K., Kadir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., et al. (2005). Genetic and Functional Characterization of Human Pemphigus Vulgaris Monoclonal Autoantibodies Isolated by Phage Display. *J. Clin. Invest.* 115, 888–899. doi:10.1172/JCI24185
- Pereira, N. F., Hansen, J. A., Lin, M.-T., Roxo, V. M. M. S., Braun, K., and Petzl-Erler, M. L. (2004). Cytokine Gene Polymorphisms in Endemic Pemphigus Foliaceus: A Possible Role for IL6 Variants. *Cytokine* 28, 233–241. doi:10.1016/j.cyt.2004.08.006
- Pérez-Pérez, M. E., Avalos-Díaz, E., and Herrera-Esparza, R. (20122012). Autoantibodies in Seneac-Usher Syndrome Cross-Reactivity or Multiple Autoimmunity? *Autoimmune Dis.* 2012, 1–7. doi:10.1155/2012/296214
- Peterson, R. A. (2012). Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. *Toxicol. Pathol.* 40, 186–204. doi:10.1177/0192623311430693
- Petzl-Erler, M. L. (2020). Beyond the HLA Polymorphism: A Complex Pattern of Genetic Susceptibility to Pemphigus. *Genet. Mol. Biol.* 43, e20190369. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2019-0369
- Pietkiewicz, P., Bowszyc-Dmochowska, M., Gomowicz-Porowska, J., and Dmochowski, M. (2018). Involvement of Nail Apparatus in Pemphigus Vulgaris in Ethnic Poles Is Infrequent. *Front. Med.* 5, 227. doi:10.3389/fmed.2018.00227
- Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R., and Hertl, M. (2018). Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clinic. Rev. Allergy Immunol.* 54, 1–25. doi:10.1007/s12016-017-8662-z
- Porro, A. M., Hans Filho, G., and Santi, C. G. (2019). Consensus on the Treatment of Autoimmune Bullous Dermatoses: Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus - Brazilian Society of Dermatology. *Braz. Dermatol.* 94, 20–32. doi:10.1590/abd1806-4841.2019940206
- Probst, C., Schlumberger, W., Stöcker, W., Recke, A., Schmidt, E., Hashimoto, T., et al. (2009). Development of EIJSA for the Specific Determination of Autoantibodies against Envoplakin and Periplakin in Paraneoplastic Pemphigus. *Clinica Chim. Acta* 410, 13–18. doi:10.1016/j.cca.2009.08.022
- Puviani, M., Marconi, A., Pincelli, C., and Cozzani, E. (2003). Fas Ligand in Pemphigus Sera Induces Keratinocyte Apoptosis through the Activation of Caspase-8. *J. Invest. Dermatol.* 120, 164–167. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12014.x
- Pyzik, M., Sand, K. M. K., Hubbard, J. J., Andersen, J. T., Sandie, L., and Blumberg, R. S. (2019). The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front. Immunol.* 10, 1540. doi:10.3389/fimmu.2019.01540
- Qian, Y., Jeong, J. S., Maldonado, M., Valenzuela, J. G., Gomes, R., Teixeira, C., et al. (2012). Cutting Edge: Brazilian Pemphigus Foliaceus Anti-desmoglein 1 Autoantibodies Cross-React with Sand Fly Salivary LJM11 Antigen. *J. I.* 189, 1535–1539. doi:10.4049/jimmunol.1200842
- Radeva, M. Y., Walter, E., Stach, R. A., Yazdi, A. S., Schlegel, N., Sarig, O., et al. (2019). ST18 Enhances PV-IgG-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion in Parallel to Increased ERK Activation. *Front. Immunol.* 10, 770. doi:10.3389/fimmu.2019.00770
- Rafei, D., Müller, R., Ishii, N., Ijazares, M., Hashimoto, T., Hertl, M., et al. (2011). IgG Autoantibodies against Desmocollin 3 in Pemphigus Sera Induce Loss of Keratinocyte Adhesion. *Am. J. Pathol.* 178, 718–723. doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.016
- Ramadan, N., Kurban, M., and Abbas, O. (2019). Possible Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Pemphigus. *Ann. Dermatol.* 31, 454. doi:10.5021/ad.2019.31.4.454
- Rapp, M., Pentland, A., and Richardson, C. (2018). Successful Treatment of Pemphigus Vulgaris with Ofatumumab. *J. Drugs Dermatol.* 17, 1338–1339.
- Razzaque Ahmed, A., and Moy, R. (1982). Death in Pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 7, 221–228. doi:10.1016/S0190-9622(82)70111-2

- Reddy, K. R., Beavers, K. L., Hammond, S. P., Lim, J. K., and Falck-Ytter, Y. T. (2015). American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Prevention and Treatment of Hepatitis B Virus Reactivation during Immunosuppressive Drug Therapy. *Gastroenterology* 148, 215–219. doi:10.1053/j.gastro.2014.10.039
- Reis, V. M. S., Toledo, R. P., Lopez, A., Diaz, I. A., and Martins, J. E. C. (2000). UVB-induced Acantholysis in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) and Pemphigus Vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42, 571–576. doi:10.1067/mjd.2000.104891
- Ren, Z., Hsu, D., Brieva, J., and Silverberg, J. I. (2019). Association between Climate, Pollution and Hospitalization for Pemphigus in the USA. *Clin. Exp. Dermatol.* 44, 135–143. doi:10.1111/ced.13650
- Rizzo, C., Fotino, M., Zhang, Y., Chow, S., Spizuoco, A., and Sinha, A. A. (2005). Direct Characterization of Human T Cells in Pemphigus Vulgaris Reveals Elevated Autoantigen-specific Th2 Activity in Association with Active Disease. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 535–540. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01836.x
- Ruocco, V., de Luca, M., Pisani, M., de Angelis, E., Vitale, O., and Astarid, C. (1982). Pemphigus Provoked by D(-)Penicillamine. *Dermatology* 164, 236–248. doi:10.1159/000250097
- Ruocco, V., De Angelis, E., and Lombardi, M. L. (1993). Drug-induced Pemphigus. II. Pathomechanisms and Experimental Investigations. *Clin. Dermatol.* 11, 507–513. doi:10.1016/0738-081x(93)90158-9
- Ruocco, V., Brenner, S., and Ruocco, E. (2001). Pemphigus and Diet: Does a Link Exist? *Int. J. Dermatol.* 40, 161–163. doi:10.1046/j.1365-4362.2001.01099.x
- Sagnelli, E., Pisaturo, M., Sagnelli, C., and Coppola, N. (2012). Rituximab-Based Treatment, HCV Replication, and Hepatic Flares. *Clin. Develop. Immunol.* 2012, 1–5. doi:10.1155/2012/945950
- Saha, M., Powell, A.-M., Bhogal, B., Black, M. M., and Groves, R. W. (2009). Pulsed Intravenous Cyclophosphamide and Methylprednisolone Therapy in Refractory Pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 162, 790–797. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09590.x
- Saito, M., Stahley, S. N., Caughman, C. Y., Mao, X., Tucker, D. K., Payne, A. S., et al. (2012). Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation. *PLoS ONE* 7, e50696. doi:10.1371/journal.pone.0050696
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164.
- Saleh, M. A., Hashimoto, R., Kase, Y., Amagai, M., and Yamagami, J. (2015). Low Pathogenicity of Anti-desmoglein 3 Immunoglobulin G Autoantibodies Contributes to the Atypical Clinical Phenotypes in Pemphigus. *J. Dermatol.* 42, 685–689. doi:10.1111/1346-8138.12888
- Salihbegović-Opalić, N., Dobl, O., and Simojlović, V. (1975). Incidence of Pemphigus in Newborn Infants Born at the Gynecologic-Obstetrical Department in Bijeljina. *Med. Arh* 29, 623–625.
- Salopeka, T. G., Logsetty, S., and Tredgetb, E. E. (2002). Anti-CD20 Chimeric Monoclonal Antibody (Rituximab) for the Treatment of Recalcitrant, Life-Threatening Pemphigus Vulgaris with Implications in the Pathogenesis of the Disorder. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47, 785–788. doi:10.1067/mjd.2002.126273
- Sardana, K., Garg, V. K., and Agarwal, P. (2013). Is There an Emergent Need to Modify the Desmoglein Compensation Theory in Pemphigus on the Basis of Dsg ELISA Data and Alternative Pathogenic Mechanisms? *Br. J. Dermatol.* 168, 669–674. doi:10.1111/bjd.12012
- Sarig, O., Bercovici, S., Zoller, L., Goldberg, I., Indelman, M., Nahum, S., et al. (2012). Population-Specific Association between a Polymorphic Variant in ST18, Encoding a Pro-apoptotic Molecule, and Pemphigus Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1798–1805. doi:10.1038/jid.2012.46
- Satyam, A., Khandpur, S., Sharma, V. K., and Sharma, A. (2009). Involvement of TH1/TH2 Cytokines in the Pathogenesis of Autoimmune Skin Disease- Pemphigus Vulgaris. *Immunological Invest* 38, 498–509. doi:10.1080/08820130902943097
- Sayar, S. K., and Küçüköglu, R. (2021). Evaluation of Non-endemic Pemphigus Foliaceus in a Large Series of Patients: a Single-center Retrospective Study from Turkey Focus on the Relapses. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 96, 422–428. doi:10.1016/j.abd.2020.12.009
- Schepens, I., Jaunin, F., Begre, N., Läderach, U., Marcus, K., Hashimoto, T., et al. (2010). The Protease Inhibitor Alpha-2-Macroglobulin-Like-1 Is the P170 Antigen Recognized by Paraneoplastic Pemphigus Autoantibodies in Human. *PLoS ONE* 5, e12250. doi:10.1371/journal.pone.0012250
- Schmidt, E., Dähnrich, C., Rosemann, A., Probst, C., Komorowski, L., Saschenbrecker, S., et al. (2010). Novel ELISA Systems for Antibodies to Desmoglein 1 and 3: Correlation of Disease Activity with Serum Autoantibody Levels in Individual Pemphigus Patients. *Exp. Dermatol.* 19, 458–463. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01069.x
- Schmidt, T., Willenborg, S., Hüning, T., Deeg, C. A., Sonderstrup, G., Hertl, M., et al. (2016). Induction of T Regulatory Cells by the Superagonistic Anti-CD28 Antibody D665 Leads to Decreased Pathogenic IgG Autoantibodies against Desmoglein 3 in a HLA-Transgenic-Mouse Model of Pemphigus Vulgaris. *Exp. Dermatol.* 25, 293–298. doi:10.1111/exd.12919
- Schmidt, E., Kasperkiewicz, M., and Joly, P. (2019). Pemphigus. *The Lancet* 394, 882–894. doi:10.1016/S0140-6736(19)31778-7
- Schmitt, T., and Waschke, J. (2021). Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. *Front. Med.* 8, 701809. doi:10.3389/fmed.2021.701809
- Schulze, K., Galichet, A., Sayar, B. S., Scothern, A., Howald, D., Zymann, H., et al. (2012). An Adult Passive Transfer Mouse Model to Study Desmoglein 3 Signaling in Pemphigus Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 132, 346–355. doi:10.1038/jid.2011.299
- Sekiguchi, M., Futai, Y., Fujii, Y., Iwasaki, T., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2001). Dominant Autoimmune Epitopes Recognized by Pemphigus Antibodies Map to the N-Terminal Adhesive Region of Desmogleins. *J. Immunol.* 167, 5439–5448. doi:10.4049/jimmunol.167.9.5439
- Shamim, T., Varghese, V. I., Shameema, P. M., and Sudha, S. (2008). Pemphigus Vulgaris in Oral Cavity: Clinical Analysis of 71 Cases. *Med. Oral Patol Oral Cir Bucal* 13 (10), E622–E626.
- Shams, S., Amirzargar, A. A., Yousefi, M., Rezaei, N., Solgi, G., Khosravi, F., et al. (2009). HLA Class II (DRB, DQA1 and DQB1) Allele and Haplotype Frequencies in the Patients with Pemphigus Vulgaris. *J. Clin. Immunol.* 29, 175–179. doi:10.1007/s10875-008-9244-x
- Shimba, A., and Ikuta, K. (2020). Control of Immunity by Glucocorticoids in Health and Disease. *Semin. Immunopathol.* 42, 669–680. doi:10.1007/s00281-020-00827-8
- Shoenfeld, Y., Aharon-Maor, A., and Sherer, Y. (2000). Vaccination as an Additional Player in the Mosaic of Autoimmunity. *Clin. Exp. Rheumatol.* 18 (2), 181–184.
- Slomov, E., Loewenthal, R., Korostishewsky, M., Goldberg, I., Brenner, S., and Gazit, E. (2005). Pemphigus Vulgaris Is Associated with the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) System. *Hum. Immunol.* 66, 1213–1222. doi:10.1016/j.humimm.2005.11.004
- Solimani, F., Mansour, Y., Didona, D., Dilling, A., Ghoreschi, K., and Meier, K. (2021). Development of Severe Pemphigus Vulgaris Following SARS-CoV-2 Vaccination with BNT162b2. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 35, e649–e651. doi:10.1111/jdv.17480
- Spindler, V., Heupel, W.-M., Efthymiadis, A., Schmidt, E., Eming, R., Rankl, C., et al. (2009). Desmocollin 3-mediated Binding Is Crucial for Keratinocyte Cohesion and Is Impaired in Pemphigus. *J. Biol. Chem.* 284, 30556–30564. doi:10.1074/jbc.M109.024810
- Spindler, V., Eming, R., Schmidt, E., Amagai, M., Grando, S., Jonkman, M. F., et al. (2018). Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 138, 32–37. doi:10.1016/j.jid.2017.06.022
- Suzan, F., Ammor, M., and Ribrag, V. (2001). Fatal Reactivation of Cytomegalovirus Infection after Use of Rituximab for a Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder. *N. Engl. J. Med.* 345, 1000. doi:10.1056/NEJM200109273451315
- Taams, L. S., Steel, K. J. A., Srenathan, U., Burns, L. A., and Kirkham, B. W. (2018). IL-17 in the Immunopathogenesis of Spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 14, 453–466. doi:10.1038/s41584-018-0044-2
- Takahashi, H., Amagai, M., Nishikawa, T., Fujii, Y., Kawakami, Y., and Kuwana, M. (2008). Novel System Evaluating *In Vivo* Pathogenicity of Desmoglein 3-reactive T Cell Clones Using Murine Pemphigus Vulgaris. *J. Immunol.* 181, 1526–1535. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1526
- Tamrazian, S., and Simpson, C. L. (2020). Autoimmune Bullous Disease in Skin of Color: A Case Series. *JAAD Case Rep.* 6, 1173–1178. doi:10.1016/j.jidcr.2020.08.035

- Tanasilovic, S., Popadic, S., Medenica, L., and Popadic, D. (2017). Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus Determined by CD86 and CTLA4 Polymorphisms. *Clin Dermatol* 35, 236–241. doi:10.1016/j.jdermatol.2016.05.021
- Tay, Y. E., Lee, S. S. J., and Lim, Y. L. (2018). Pemphigus Herpetiformis with Autoantibodies to Desmocollins 1, 2 and 3. *Clin Exp Dermatol* 43, 360–362. doi:10.1111/ced.13355
- Thongprasom, K., Pengpis, N., Phattarataratip, E., and Samaranayake, L. (2021). Oral Pemphigus after COVID-19 Vaccination. *Oral Dis*. doi:10.1111/odi.14034
- Timoteo, R. P., da Silva, M. V., Miguel, C. B., Silva, D. A. A., Catarino, J. D. S., Rodrigues Junior, V., et al. (2017/2017). Th1/Th17-Related Cytokines and Chemokines and Their Implications in the Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Mediators Inflamm*. 2017, 1–9. doi:10.1155/2017/7151285
- Torzecka, J. D., Narbutt, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Borowiec, M., Ptasińska, A., Woszczyk, G., et al. (2003). Tumor Necrosis Factor- α Polymorphism as One of the Complex Inherited Factors in Pemphigus. *Mediators Inflamm*. 12, 303–307. doi:10.1080/09629350310001619735
- Toumi, A., Abida, O., Ben Ayed, M., Masmoudi, A., Turki, H., and Masmoudi, H. (2013). Cytokine Gene Polymorphisms in Tunisian Endemic Pemphigus Foliaceus: a Possible Role of IL-4 Variants. *Hum Immunol* 74, 658–665. doi:10.1016/j.humimm.2013.01.009
- Tron, P., Gilbert, D., Joly, P., Mouquet, H., Drouot, L., Ayed, M. B., et al. (2006). Immunogenetics of Pemphigus: an Update. *Autoimmunity* 39, 531–539. doi:10.1080/08916930600971497
- Tsankov, N., Vassileva, S., Kamarashev, J., Kazandjieva, J., and Kuzeva, V. (2000). Epidemiology of Pemphigus in Sofia, Bulgaria. A 16-year Retrospective Study (1980–1995). *Int J Dermatol* 39, 104–108. doi:10.1046/j.1365-4362.2000.00864.x
- Tsuchisaka, A., Numata, S., Teye, K., Natuaki, Y., Kawakami, T., Takeda, Y., et al. (2016). Epiplakin Is a Paraneoplastic Pemphigus Autoantigen and Related to Bronchiolitis Obliterans in Japanese Patients. *J Invest Dermatol* 136, 399–408. doi:10.1038/jid.2015.408
- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., et al. (2003). Induction of Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3. *J Immunol* 170, 2170–2178. doi:10.4049/jimmunol.170.4.2170
- Tsuruta, D., Ishii, N., Hamada, T., Ohyama, B., Fukuda, S., Koga, H., et al. (2011). IgA Pemphigus. *Clin Dermatol* 29, 437–442. doi:10.1016/j.jdermatol.2011.01.014
- Tunca, M., Musabak, U., Sagkan, R. I., Koc, E., and Akar, A. (2010). Association of Human Leukocyte Antigen Class II Alleles with Pemphigus Vulgaris in a Turkish Population. *J Dermatol* 37, 246–250. doi:10.1111/j.1346-8138.2009.00743.x
- Turrentine, J. E., Sokumbi, O., and Agim, N. G. (2014). Blisters and Erosions in a Neonate. *JAMA Dermatol* 150, 1223. doi:10.1001/jamadermatol.2014.2087
- Ueda, A., Ishii, N., Teye, K., Dainichi, T., Ohyama, B., Hamada, T., et al. (2013). Unique Herpetiform Bullous Dermatitis with IgG Antibodies to Desmocollins 1/3 and IAD-1. *Br J Dermatol* 169, 719–721. doi:10.1111/bjd.12398
- Valikhani, M., Kavusi, S., Chams-Davatchi, C., Daneshpazhooch, M., Barzegari, M., Ghiasi, M., et al. (2007). Pemphigus and Associated Environmental Factors: a Case-control Study. *Clin Exp Dermatol* 32, 256–260. doi:10.1111/j.1365-2230.2007.02390.x
- Valikhani, M., Kavusi, S., Chams-Davatchi, C., Hallaji, Z., Esmaili, N., Ghandi, N., et al. (2008). Impact of Smoking on Pemphigus. *Int J Dermatol* 47, 567–570. doi:10.1111/j.1365-4632.2008.03645.x
- Veldman, C., Stauber, A., Wassmuth, R., Uter, W., Schuler, G., and Hertl, M. (2003). Dichotomy of Autoreactive Th1 and Th2 Cell Responses to Desmoglein 3 in Patients with Pemphigus Vulgaris (PV) and Healthy Carriers of PV-Associated HLA Class II Alleles. *J Immunol* 170, 635–642. doi:10.4049/jimmunol.170.1.635
- Veldman, C., Höhne, A., Dieckmann, D., Schuler, G., and Hertl, M. (2004). Type I Regulatory T Cells Specific for Desmoglein 3 Are More Frequently Detected in Healthy Individuals Than in Patients with Pemphigus Vulgaris. *J Immunol* 172, 6468–6475. doi:10.4049/jimmunol.172.10.6468
- Veldman, C., Pahl, A., Beisert, S., Hansen, W., Buer, J., Dieckmann, D., et al. (2006). Inhibition of the Transcription Factor Foxp3 Converts Desmoglein 3-Specific Type 1 Regulatory T Cells into Th2-like Cells. *J Immunol* 176, 3215–3222. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3215
- Verma, G., Tegta, G., Sharma, A., Kaur, M., and Sharma, S. (2020). A Rare Case of Extensive Pemphigus Vegetans. *Indian Dermatol Online J* 11, 87–90. doi:10.4103/idoj.IDOJ_83_19
- Vinay, K., Kamwar, A. J., Mittal, A., Dogra, S., Minz, R. W., and Hashimoto, T. (2015). Intralesional Rituximab in the Treatment of Refractory Oral Pemphigus Vulgaris. *JAMA Dermatol* 151, 878. doi:10.1001/jamadermatol.2014.3674
- Vodo, D., Sarig, O., Geller, S., Ben-Asher, E., Olender, T., Bochner, R., et al. (2016). Identification of a Functional Risk Variant for Pemphigus Vulgaris in the ST18 Gene. *PLoS Genet* 12, e1006008. doi:10.1371/journal.pgen.1006008
- Vodo, D., Sarig, O., and Sprecher, E. (2018). The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med* 5, 226. doi:10.3389/fmed.2018.00226
- Völlner, F., Ali, J., Kurrie, N., Exner, Y., Eming, R., Herft, M., et al. (2016). Loss of Flotillin Expression Results in Weakened Desmosomal Adhesion and Pemphigus Vulgaris-like Localisation of Desmoglein-3 in Human Keratinocytes. *Sci Rep* 6, 28820. doi:10.1038/srep28820
- von Köckritz, A., Ständer, S., Zeidler, C., Metzke, D., Luger, T., and Bonsmann, G. (2017). Successful Monotherapy of Pemphigus Vegetans with Minocycline and Nicotinic Acid. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 31, 85–88. doi:10.1111/jdv.13779
- Warren, S. J. P., Lin, M.-S., Giudice, G. J., Hoffmann, R. G., Hans-Filho, G., Aoki, V., et al. (2000). The Prevalence of Antibodies against Desmoglein 1 in Endemic Pemphigus Foliaceus in Brazil. *N Engl J Med* 343, 23–30. doi:10.1056/NEJM200007063430104
- Weber, A. N. R., Bittner, Z., Liu, X., Dang, T.-M., Radsak, M. P., and Brunner, C. (2017). Bruton's Tyrosine Kinase: An Emerging Key Player in Innate Immunity. *Front Immunol* 8, 1454. doi:10.3389/fimmu.2017.01454
- Werth, V. P., Frensón, D., Pandya, A. G., Chen, D., Rico, M. J., Albrecht, J., et al. (2008). Multicenter Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Clinical Trial of Dapsone as a Glucocorticoid-Sparing Agent in Maintenance-phase Pemphigus Vulgaris. *Arch Dermatol* 144, 25–32. doi:10.1001/archderm.144.1.25
- Werth, V. P., Culton, D. A., Concha, J. S. S., Graydon, J. S., Blumberg, L. J., Okawa, J., et al. (2021). Safety, Tolerability, and Activity of AIXN1830 Targeting the Neonatal Fc Receptor in Chronic Pemphigus. *J Invest Dermatol* 141 (21), 2858–2865. doi:10.1016/j.jid.2021.04.031
- Werth, V. P. (1996). Treatment of Pemphigus Vulgaris with Brief, High-Dose Intravenous Glucocorticoids. *Arch Dermatol* 132, 1435. doi:10.1001/archderm.1996.03890360021005
- Czemik, A., and Wiecek, M. (2016). Paraneoplastic Pemphigus: a Short Review. *Crit Vol* 9, 291–295. doi:10.2147/CCID.S100802
- Wilson, C. L., Wojnarowska, F., Dean, D., and Patrucha, J. S. (1993). IgG Subclasses in Pemphigus in Indian and UK Populations. *Clin Exp Dermatol* 18, 226–230. doi:10.1111/j.1365-2230.1993.tb02175.x
- Wolf, R., and Ruocco, V. (1997). Gaining More Insight into the Pathomechanisms of Thiol-Induced Acantholysis. *Med Hypotheses* 48, 107–110. doi:10.1016/s0306-9877(97)90277-2
- Xu, R.-C., Zhu, H.-Q., Li, W.-P., Zhao, X.-Q., Yuan, H.-J., Zheng, J., et al. (2013). The Imbalance of Th17 and Regulatory T Cells in Pemphigus Patients. *Eur J Dermatol* 23, 795–802. doi:10.1684/ejd.2013.2177
- Yakın, B., and Alli, N. (2007). Pemphigus Vulgaris Following Antirabies Vaccination. *J Dermatol* 34, 734–735. doi:10.1111/j.1346-8138.2007.00373.x
- Yamagami, J., Kadir, S., Ishii, K., Payne, A. S., Siegel, D. L., and Stanley, J. R. (2009). Antibodies to the Desmoglein 1 Precursor Proprotein but Not to the Mature Cell Surface Protein Cloned from Individuals without Pemphigus. *J Immunol* 183, 5615–5621. doi:10.4049/jimmunol.0901691
- Yan, L., Wang, J. M., and Zeng, K. (2012). Association between HLA-DRB1 Polymorphisms and Pemphigus Vulgaris: a Meta-analysis. *Br J Dermatol* 167, 768–777. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11040.x
- Yasuda, H., Kobayashi, H., Hashimoto, T., Itoh, K., Yamane, M., and Nakamura, J. (2000). Subcorneal Pustular Dermatitis Type of IgA Pemphigus: Demonstration of Autoantibodies to Desmocollin-1 and Clinical Review. *Br J Dermatol* 143, 144–148. doi:10.1046/j.1365-2133.2000.03604.x
- Yatim, A., Boheday, G., Grootenboer-Mignot, S., Prost-Squarcioni, C., Alexandre, M., Le Roux-Villet, C., et al. (2019). Paraneoplastic Pemphigus Revealed by Anti-programmed Death-1 Pembrolizumab Therapy for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Complicating Hidradenitis Suppurativa. *Front Med* 6, 249. doi:10.3389/fmed.2019.00249

- Yeo, W., Chan, T. C., Leung, N. W. Y., Lam, W. Y., Mo, F. K. F., Chu, M. T., et al. (2009). Hepatitis B Virus Reactivation in Lymphoma Patients with Prior Resolved Hepatitis B Undergoing Anticancer Therapy with or without Rituximab. *JCO* 27, 605–611. doi:10.1200/JCO.2008.18.0182
- Yokoyama, T., Matsuda, S., Takae, Y., Wada, N., Nishikawa, T., Amagai, M., et al. (2011). Antigen-independent Development of Foxp3+ Regulatory T Cells Suppressing Autoantibody Production in Experimental Pemphigus Vulgaris. *Int. Immunol.* 23, 365–373. doi:10.1093/intimm/dxr020
- Yoshida, K., Ishii, K., Shimizu, A., Yokouchi, M., Amagai, M., Shiraishi, K., et al. (2017). Non-pathogenic Pemphigus foliaceus (PF) IgG Acts Synergistically with a Directly Pathogenic PF IgG to Increase Blistering by p38MAPK-dependent Desmoglein 1 Clustering. *J. Dermatol. Sci.* 85, 197–207. doi:10.1016/j.jdermsci.2016.12.010
- Yu, Y., and Su, K. (2013). Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Cell Immunol.* 04, 139. doi:10.4172/2155-9899.1000139
- Yusuf, M. Y. M., Vital, E. M., McEhenny, D. M., Hensor, E. M. A., Das, S., Dass, S., et al. (2019). Predicting Severe Infection and Effects of Hypogammaglobulinemia during Therapy with Rituximab in Rheumatic and Musculoskeletal Diseases. *Arthritis Rheumatol.* 71, 1812–1823. doi:10.1002/art.40937
- Zarza, I., Sellami, A., Bouguerra, C., Sellami, M. K., Chelly, I., Zitouna, M., et al. (2011). Pemphigus Vegetans: a Clinical, Histological, Immunopathological and Prognostic Study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25, 1160–1167. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03939.x
- Zhao, C. Y., Chiang, Y. Z., and Murrell, D. F. (2016). Neonatal Autoimmune Blistering Disease: A Systematic Review. *Pediatr. Dermatol.* 33, 367–374. doi:10.1111/pde.12859
- Zhou, S. H., Lin, L., Jin, P. Y., and Ye, S. Z. (2003). Association between HLA-DRB1, DQB1 Genes and Pemphigus Vulgaris in Chinese Hans. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 20 (1), 79–81.
- Zhou, S., Liu, Z., Yuan, H., Zhao, X., Zou, Y., Zheng, J., et al. (2020). Autoreactive B Cell Differentiation in Diffuse Ectopic Lymphoid-like Structures of Inflamed Pemphigus Lesions. *J. Invest. Dermatol.* 140, 309–318. e8. doi:10.1016/j.jid.2019.07.117
- Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., et al. (2010). IL-21 Regulates Germinal center B Cell Differentiation and Proliferation through a B Cell-Intrinsic Mechanism. *J. Exp. Med.* 207, 365–378. doi:10.1084/jem.20091777
- Zou, Y., Yuan, H., Zhou, S., Zhou, Y., Zheng, J., Zhu, H., et al. (2021). The Pathogenic Role of CD4+ Tissue-Resident Memory T Cells Bearing T Follicular Helper-like Phenotype in Pemphigus Lesions. *J. Invest. Dermatol.* 141, 2141–2150. doi:10.1016/j.jid.2021.01.030
- Zuercher, A. W., Spirig, R., Baz Morelli, A., Rowe, T., and Käsemann, F. (2019). Next-generation Fc Receptor-Targeting Biologics for Autoimmune Diseases. *Autoimmun. Rev.* 18, 102366. doi:10.1016/j.autrev.2019.102366

Conflict of Interest: BJ receives research funding from Bronik. PM is a consultant for Servier.

The remaining 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.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Lim, Bohelay, Hanakawa, Musette and Janela. 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.

Annexe II



Clinical and biological activity of rituximab in the treatment of pemphigus

Gérôme Bohelay¹, Frédéric Caux¹ & Philippe Musette^{*1}

¹Department of Dermatology, Groupe Hospitalier Paris Seine-Saint-Denis, AP-HP & INSERM UMR1125, Bobigny, France

*Author for correspondence: Tel.: +33 1 48 95 51 89; philippe.musette@aphp.fr

B-cells are major effector cells in autoimmunity since they differentiate into plasmocytes that produce pathogenic auto-antibody such as anti-desmoglein antibodies in pemphigus patients. Major advances were obtained using whole B-cell depleting therapies including anti-CD20 antibodies in refractory pemphigus patients that lead to rituximab approval in pemphigus patients in EU and USA. This review summarizes the data supporting the efficacy of rituximab in pemphigus and provides an overview of the reported immunological changes underlying its therapeutic action. Short and long-term remission in pemphigus is explained by the removal of autoreactive B-cells involved in the production of pathogenic IgG auto-antibodies and by enhancement of the appearance of regulatory B-cells that could maintain long term immune tolerance.

First draft submitted: 29 June 2020; Accepted for publication: 28 September 2020; Published online: 13 October 2020

Keywords: B-cell depletion therapy • CD20 • monoclonal antibody • pemphigus • rituximab

Pemphigus is a life-threatening autoimmune blistering disease affecting the skin and mucosae (1). It is mediated by pathogenic auto-antibodies directed against desmoglein 1 (Dsg1) and desmoglein 3 (Dsg3), adhesion molecules of the epidermis that are responsible for the cohesion between keratinocytes in skin and mucosa, respectively (2,3). Muco-cutaneous pemphigus is caused by anti-Dsg1 and Dsg3 auto-antibodies whereas anti-Dsg3 causes a mucosal form of pemphigus, and anti-Dsg1 a cutaneous only form of superficial pemphigus (4). High and sustained doses of systemic corticosteroids (CS) were previously considered as the first line standard treatment for patients with pemphigus (5). Additionally, there is only fair evidence to support the use of conventional immunosuppressants (ISA) as first-line treatment in pemphigus, since these drugs have not demonstrated a clear beneficial effect over CS alone, limiting their use as CS sparing agents (5).

B-cell depletion strategies have been proposed to treat severe autoimmune disorders. The efficacy of a single cycle of rituximab (RTX) in severe pemphigus had previously been reported (6). RTX is a monoclonal antibody directed against the CD20 antigen of B lymphocytes which induces prolonged B-cell depletion followed by a 6 months delayed recovery (7). It is highly effective in severe and relapsing types of pemphigus in open clinical trials (6,8). Some uncontrolled case series have also suggested that RTX as adjuvant immunosuppressive therapy in pemphigus would allow a rapid tapering of CS doses and might increase the rate of complete remission off therapy (CRoff) (1,9). Because long-term CS therapy is responsible for severe side effects, Joly *et al.* conducted a randomized trial comparing a 'standard' treatment with prednisone given for 12–18 months to a 'RTX + mild CS regimen' associating rituximab and lower initial doses of prednisone, which were rapidly tapered over 3–6 months (10). The primary aim was to assess whether the latter substantially improves the rate of long-term CRoff in patients with pemphigus, and determine whether cumulative CS doses and severe treatment side effects were decreased relative to the 'standard' regimen. In this trial including 90 patients, more patients were in CRoff at month 24 in the 'RTX + mild CS regimen' group than in the 'standard' CS group ($p < 0.0001$). Interestingly long-term remissions after RTX therapy have previously been shown to be associated with prolonged decrease of specific Dsg1 and Dsg3 B-cell response associated with an increase of regulatory B-cells (11).

Rituximab

RTX is a murine-human chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (Ab), with a human Fc portion and a murine variable region which serves as CD20 binding site on its large extracellular loop [7].

The differentiation marker CD20 is a transmembrane calcium channel glycoprotein implicated in B-cell activation, proliferation and differentiation, expressed on the cell surface of late pre-B-cell stage to naive follicular B-cells and mature memory B cells [12]. CD20 is thus expressed by auto reactive B-cells responsible for the production of anti-Dsg pathogenic auto-Ab. Strikingly CD20 deficiency in mice and humans was not found to interfere with B-cell development and proliferation but can lead to hypogammaglobulinemia in the presence of normal B-cell numbers.

A variety of mechanisms leads to death of RTX-coated B-cells after monoclonal Abs binding to CD20 (Figure in Supplementary Data) including direct cell death by triggering of apoptosis, complement-dependent cytotoxicity and Fc gamma receptor-mediated depletion through cellular effectors including antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cellular phagocytosis [13–15]. B-cell depletion thus depends on individual polymorphisms of factors involved in these different mechanisms such as CD20-bounded RTX internalization rates, Fc gamma receptor polymorphisms, defect in cellular actors or impaired functions reported in auto-immune diseases [16–18].

Pemphigus patients treated with rituximab

RTX was first approved in 1997 for non-Hodgkin lymphoma and initially used in paraneoplastic pemphigus in 2001 and in pemphigus vulgaris (PV) in 2002 [19,20]. Its increasing off-label use was reported in case reports and series, in association with systemic CS, and mostly in combination with other ISA in severe or recalcitrant pemphigus (Table 1) [6,8–11,19,21–45]. Initial studies employed a lymphoma protocol (LP) for RTX dosing regimen using four weekly infusions of 375 mg/m² but then a rheumatoid arthritis protocol (RAP) using two infusions of 1000 mg 2 weeks apart [30]. The latter is currently the most employed because it requires fewer infusions and medication [28]. Both protocols were used in trials but only RAP was investigated in randomized clinical trials [10,45]. No randomized trial comparing both protocols is available and meta-analyses did not demonstrate a significant difference in overall outcomes between both regimens [46–48]. Thus, both protocols for RTX therapy can be used in pemphigus.

These uncontrolled studies suggested that RTX is effective in association with CS and other ISA to achieve clinical remission in pemphigus patients (Table 1). Some studies demonstrated that a single cycle of RTX in association with CS allowed complete clinical remission in naive patients or patients in whom ISA have been stopped [6,28,31]. RTX was proved to be effective when used as adjuvant therapy in association with CS and in some patients with other ISA, or in first line, notably in patients with contraindication to oral CS, and to induce CRoff in long-term follow-up [6,11,30,37,38,45]. Most patients responded to RTX, obtaining disease control in 4–6 weeks [47]. Complete clinical remission was achieved in 76–90% with a median time of 6 months after one cycle, with approximately 27–40% of patients being in CRoff therapy after a mean time of 15 months [47]. Mean remission duration ranged from 15 to 17 months, allowing to safely taper ISA with a significant CS-sparing effect, but relapses were reported in 40–100 % of patients [39,46,47].

Alongside these trials and two meta-analyses, RTX was proved to be effective in a large prospective, multicenter, randomized trial in moderate-to-severe newly diagnosed pemphigus patients [10]. In this Ritux 3 study, the first line use of RTX (1000 mg on days 0 and 14 and 500 mg at months 12 and 18) combined with short-term prednisone (0.5–1.0 mg/kg/day, tapered over 3–6 months) proved to be more effective and safer than prednisone alone (1.0–1.5 mg/kg/day, tapered over 12–18 months); it resulted in a lower relapse rate which parallels the absence of increase of anti-Dsg auto-Ab and B-cells [10]. RTX and short-term CS combination resulted in 89% of patients achieving CRoff compared with 34% of patients with CS alone after 2 years. A dramatic decrease of cumulative CS dose (three-times less) and adverse events (two-times less) was observed in the RTX arm in comparison with patients receiving CS only. These results were confirmed in the post-hoc analysis focusing on patients with PV with a 90% rate of CRoff after a 2-year follow-up, a median CRoff duration longer by four-times, half as many relapses, and a median cumulative dose of CS to be 3.5-times less in the RTX arm [50].

The Ritux 3 study demonstrated the benefit of RTX as a first-line treatment in pemphigus patients in term of disease control, safety and long-term clinical remission and sparing of concomitant immunosuppressants. Based on these studies, RTX was recently US FDA and EMA approved for the treatment of moderate-to-severe pemphigus. It was then recommended as first line treatment with CS in new-onset moderate-to-severe pemphigus or patients

Table 1. Selection of studies reporting rituximab therapy in pemphigus patients.

Study, year	Intervention	Rituximab dose	Concurrent ISA	N of patients (PV/PS/other)	CR rate (%)	FR	RR	Median follow-up (months)	Med anto relapse (months)	Severe adverse events	Ref.
Heizmann et al., 2001	First CR PNP	LP	ISA	1 (0/0/1)	100	NA	NA	12	NA	NA	[19]
Herrmann et al., 2003	First CR in PV	LP	ISA	1 (1/0/0)	100	NA	NA	1	NA	NA	[21]
Morrison et al., 2004	First case series	LP	ISA	3 (3/0/0)	66	33	NA	18	NA	1 Pneumocystis jirovecii pneumoniae	[22]
Arin et al., 2005	Case series	LP	SA	5 (4/1/0)	60	40	NA	18	NA	FR: NA %	[23]
Ahmed et al., 2006	First NR prospective CT Maintenance RTX + IVS	375 mg/m ² /week (3 weeks) then monthly (4 months)	ISA + IgIV	11 (11/0/0)	82	0	18.1	32.5	12	Severe infection: 29% (1 death of septicemia)	[8]
Joly et al., 2007	NR prospective CT Single cycle efficacy	LP, single cycle	CS alone	21 (14/7/0)	86	10	43	34	19	Severe infection: 10% (1 death of septicemia)	[6]
Shimanovich, 2008	NR prospective CT	LP	ISA (PA SA)	7 (5/2/0)	43	ND	40	21	ND	1 Pneumocystis jirovecii pneumoniae, 1 deep venous thrombosis	[24]
Leud et al., 2009	RCS Large study	LP	ISA	88 (88/0/0)	80.7	11.7	17	34	NA	Infection rate: 15%	[25]
Kim et al., 2011	RCS Comparison between dose	375 mg/m ² /week Gr 1 (2 infusions) Gr 2 (3 infusions)	NA	27 (25/2/0)	73 (gr 2)	7 (gr 2)	67	16	NA	1 death of gastric perforation	[26]
Horvath et al., 2012	NR prospective CT Low-dose infusion	Low-dose RAP (500 mg, twice)	SA	15 (12/3/0)	53	47	40	13	14	FR: 13%, Severe infections: 7% HSV infections: 7%, Cardiac arrhythmia: 7%	[27]
Gandini et al., 2012	NR prospective CT RAP without ISA	RAP	CS alone	42 (37/5/0)	86	14	43	26.5	16	FR: 29% Severe infections: 24%	[28]
Lunardon et al., 2012	RCS Follow-up after multiple injections	LP	SA	31 (24/7/0)	58	16	44	32	15	Severe infection: 6%	[9]
Kanwar et al., 2013	RCS Few SA use	LP or RAP	SA (10%)	10 (9/1/0)	70	20	NA	8	NA	FR: 30% Infections: 20%	[29]
Leshem et al., 2013	RCS High number of patients	RAP	ISA (62%)	47 (42/3/0)	40	36	22	18	8	FR: 13% Severe flare up: 8% Viral skin infection: 4%	[30]
Collioou et al., 2013	RCS, First long-term follow-up	LP	CS	22 (14/7/1)	58	42	77	79	79	Death: 14% (1 septic emia, 2 cardiovascular diseases)	[11]

AE: Adverse event; AZA: Azathioprine; CR: Complete remission off and on therapy; CS: Corticosteroid; CT: Clinical trial; Gr: Group; HAICA: Human antichimeric antibodies; HSV: Herpes virus simplex 1 SA: Immunosuppressant except CS; LP: Lymphoma protocol (375 mg/m² once weekly for 4 weeks); NA: Not available; ND: No data; NR: Non-randomized; PA/SA: Partial response; PS: Pemphigus; PV: Pemphigus vulgaris; RAP (Rituximab arthritis protocol, 1 g twice 15 days apart); RCS: Retrospective cohort study; RR: Relapse rate; SAE: Severe adverse event.

Table 1. Selection of studies reporting rituximab therapy in pemphigus patients (cont.).

Study, year	Interest	Rituximab dose	Concurrent ISA	No of patients (P/PS, o/field)	C.R rate (%)	PR	RR	Median follow-up (months)	Median to relapse (months)	Severe adverse events	Ref.
Baligh et al., 2013	NR, prospective CT CS alone High number	LP	CS alone at baseline but ISA in follow-up	45 (45/0/0)	100	0	52.5	12	8	Infections 11%, 0% HSV infection, 2% pneumonia, 2% lung abscess Thrombotic events: 4%	[31]
Cho et al., 2014	RCS Comparison between RTX doses	375 mg/m ² infusions 3 or 4 in Gr1, 2 in Gr2	ISA Gr1: 100% Gr2: 50%	23 (15/8/0) Gr1: 7/3 Gr2: 8/5	60 (1) 69.2 (2)	40 (1) 31.8 (2)	50 (1) 23 (2)	25.6 (1) 17.8 (2)	15.6 (1) 12.3 (2)	No SAE reported	[32]
Gregoriou et al., 2014	NR, prospective, CT prophylactic re-injection	LP; then 1 infusion for half patients at 6 month	CS + ISA	19 (17/1/1)	100	0	42	9–48	NR	No SAE reported	[33]
Kamwar et al., 2014	Prospective, randomized, observer blind CT	Gr1: full dosage RAP Gr2: half dosage RAP	CS alone + AZA if disease control not achieved	22 (15/7/0) Gr1: 7/4 Gr2: 8/3	100	0	36 (1) 64 (2)	12	9 (1) 8 (2)	No SAE reported	[45]
Mnay et al., 2014	RCS in children	500 mg or 375 mg/m ² twice, 15 days apart	ISA	10 (7/3/0)	80	10	60	16	13	IRR 10% Angioedema	[34]
Cho et al., 2014	RCS, first line use Regimen dosage	500 mg weekly, 4 weeks	CS alone	9 (6/3/0)	100	0	89	22	11	No SAE reported	[35]
Heelan et al., 2014	Large RCS	RAP; then 1 g or 0.5 g every 6 months if needed	ISA	92 (84/8/0)	89	5	61	24	15	RR: 16% (51% of it during the first infusion)	[36]
Ingen-Housz-Oro et al., 2015	RCS, first-line RTX with topical CS	1 g i.v. on days 1 and 15	Topical CS alone	5 (5/0/0)	80	20	60	63	16	No SAE reported	[37]
Ahmed et al., 2016	RCS First line use RTX + IVIG maintenance	375 mg/m ² weekly for 8 weeks then monthly for 4 months	IVIG (2 g/kg/cycle) for 24 months	10 (10/0/0)	100	0	0	79.3	NA	No SAE reported	[38]
Joly et al., 2017	Randomized, prospective, unblinded CT	RTX (1g on days 0 and 14 and 0.5g at 12 and 18 months in Gr 1	CS: initial dosage and tapering differing between severity and arms CS + AZA	90 (74/16/0) Gr1: 36/8 Gr2: 38/8	89 34	11 64	11 45	24	NA	SAE: 27 events in 16 patients (Gr1) and 53 events in 29 patients (Gr2)	[10]
Saleh et al., 2018	Prospective, NR CT, Analysis of early vs late relapse to identify predictive factors	RAP, 1 cycle	CS + AZA	19 (14/5/0)	73.6	26.4	100	26	10.5–17.5	-	[39]

AE: Adverse event; AZA: Azathioprine; C.R: Case report; C.R: Complete remission off and on therapy; CS: Corticosteroid; C.T: Clinical trial; Gr: Group; HAACA: Human anti-chimeric antibodies; HSV: Herpes virus simplex; ISA: immunosuppressant except CS; LP: Lymphoma protocol (375 mg/m² once weekly for 4 week); NA: Not available; NR: No data; NR: Non randomized; P/A: Partial response; P/S: Pemphigus vulgaris; P/V: Pemphigus vulgaris; R/R: Relapse rate; R/S: Retrospective cohort study; RR: Relapse rate; SAE: Severe adverse event.

Table 1. Selection of studies reporting rituximab therapy in pemphigus patients (cont.).

Study, year	Interest	Rituximab dose	Concurrent ISA	N of patients (PV/PS/other)	CR rate (%)	PR	RR	Median follow-up (months)	Median to relapse (months)	Severe adverse events	Ref.
Sanchez et al., 2018	RCS Maintenance with RTX	RTX 1 g every 6 months for 12/18 months	No ISA	11 (9/2/0)	100	0	NA	33	NA	5/11 had grade 3 or 4 AE with (sepsis, diabetes 2, arterial hypertension 1, endocrine disorder 1)	[40]
Mnay et al., 2018	RCS, Early vs late use of RTX	RAP Gr 1: first line before ISA Gr 2: refractory to ISA	No ISA	29 (19/10/0) 9 (Gr1) 20 (Gr2)	CRoR: 87.5 66.5	NA	44.4 31.8	NA	NA	NA	[41]
Russo et al., 2020	Prospective, NR, CT Ultra-low dose	Low-dose RTX 200 mg single infusion	Low-dose CS	8 (8/0/0) of whom 6 naive of RTX	62.5	37.5	12.5	12	NA	Severe infections 25% (Citrobacter koseri infection, Haemophilus influenzae pneumoniae)	[42]
Shimanovich et al., 2020	RCS High number Long-term follow-up	LP + RAP	CS +/- IS	59 (45/14/0)	1 cycle: 73 Few cycles: 95 CRoR at 36 months: 27	1 cycle: 17	63%	104	25	Severe infections 12% (1 death due to septic shock)	[43]
Toodi et al., 2019	Prospective, NR, CT biosimilar	RAP or LP, biosimilar	CS	110 (110/0/0)	47	10	NA	16	12	Adverse events: 30% (mostly RR) Paradoxical flare: 1% Infection: 2% (1 HSV keratitis, 1 bacterial skin infection)	[44]
Khanfar et al., 2020	RCS in children	IP for 11 and RAP for 1	CS +/- IS	12 (10/2/0)	66%	25%	75%	47	23	RR: 58% 1 severe infection with cerebrovascular thrombosis	[45]

AE: Adverse event; AZA: Azathioprine; CR: Case report; CR: Complete remission off and on therapy; CS: Corticosteroid; CT: Clinical trial; Gr: Group; HAACA: Human antichimeric antibodies; HSV: Herpes virus; ISA: Immunosuppressant except CS; LP: Lymphoma protocol (375 mg/m² once weekly for 4 weeks); NA: Not available; ND: No data; NR: Non randomized; PAIA: Protein A immunoadsorption; PR: Partial response; PS: Pemphigus; PV: Pemphigus vulgaris; RAP (Rituximab) arthritis protocol, 1 g twice 15 days apart; RCS: Retrospective cohort study; RR: Relapse rate; SAE: Severe adverse event.

not controlled with CS alone or in combination with other ISA (51,52). Recently, the EADV guidelines suggested the use of rituximab as an option in first line, alone or in combination with CS for mild pemphigus foliaceus or vulgaris (53).

A Phase III, randomized, double-blind, double-dummy, active-comparator, parallel-arm multicenter trial (NCT02383589) comparing the efficacy and safety of RTX and mycophenolate mofetil (MMF) in 135 moderate-to-severe pemphigus recently ended but its publication is still pending.

Infusion dose

The optimal dosing of RTX in one cycle to achieve the better outcomes with the fewest course is still debated. The usual protocols are the LP or RAP but some studies reported low-dose (2 infusions of 500 mg or 375 mg/m²) or ultra-low dose regimen (1 single infusion of 200 mg) to be effective in obtaining early and long-term remission and depleting B-cell (11,27,36,42,45). However even if some retrospective studies with short follow-up described no difference in outcome or B-cell depletion with lower dosage (32), others demonstrated in a randomized comparative study that clinical, B-cell depletion and immunological parameters seems to be better improved with full dose regimen (45). Further comparative controlled studies are thus needed to confirm long-term efficacy of low-dose and ultra-low dose and the possible better safety profile of these schedules for RTX, which could also have the advantage to reduce the costs.

Specific populations

As patients below 18 years old are usually excluded from clinical trials, there is little information about efficacy and safety of RTX in young populations. Small series reported in children suggested similar results than in adult patients, notably in first-line use in association with CS (Table 1) (34,49). In the absence of a specific RTX administration protocol in pediatric patients, LP is usually used or RAP with a lower dose (500 mg).

Intralesional rituximab

Intralesional administration of RTX was used for difficult to treat lesions involving the oral cavity or the scalp of few pemphigus patients recalcitrant to CS, conventional ISA and intravenous RTX (54,55). These low-dose administrations of RTX (100 mg) allowed a complete remission in four patients with subsequent relapse in one (54,55). In a prospective clinical trial including 21 pemphigus patients with concurrent treatment with CS and ISA, intralesional RTX injections showed a similar efficacy than triamcinolone injections (56). Interestingly these low-dose local injections resulted in a similar peripheral B-cell depletion as intravenous infusions (55). This way of administration would deserve to be more investigated, notably in recalcitrant patients with solitary lesions. Recently, ectopic lymphoid-like structures composed of immature and mature B-cells with high rate of autoreactive lymphocytes, plasma cells and CD4⁺ T-cells were recently found to infiltrate the dermis from pemphigus patients, to be responsible of local auto-Ab production and to be involved in recalcitrant chronic lesions (57,58). These observations of tertiary lymphoid structure demonstrated by one team need to be ascertained. If confirmed, studying these structures in case of intralesional RTX administration on recalcitrant lesion could give important information as secondary lymphoid organs are difficult to sample in pemphigus.

Immunological effects of rituximab

The immunological actors at baseline and the changes of B-cell depletion after RTX therapy and B-cell repopulation are summarized in Figure 1.

B-cell depletion & auto-Abs decrease with RTX therapy

RTX treatment results in a rapid B-cell depletion from the peripheral blood in a few hours and causes a long-lasting depletion as circulating B-cell pool will only reconstitutes 6–12 months later from stem cells (59). This depletion affects in particular auto reactive B-cell clones that could have persisted for years before to result in pathogenic auto-Ab decrease (60).

Nevertheless, B-cells are differentially depleted according to their localization in the body and the density of CD20 molecules on their surface. Long-lived plasma cells (LLPCs), mainly CD20⁻, are spared because they do not bear CD20, occupy survival niches and do not require ongoing contributions from the memory B-cell (MBC) pool for their maintenance (61). The collapse of new mature B-cells and short-lived plasma cells production might be responsible for the decrease in total serum IgM observed in humans after RTX injections, whereas the sparing of

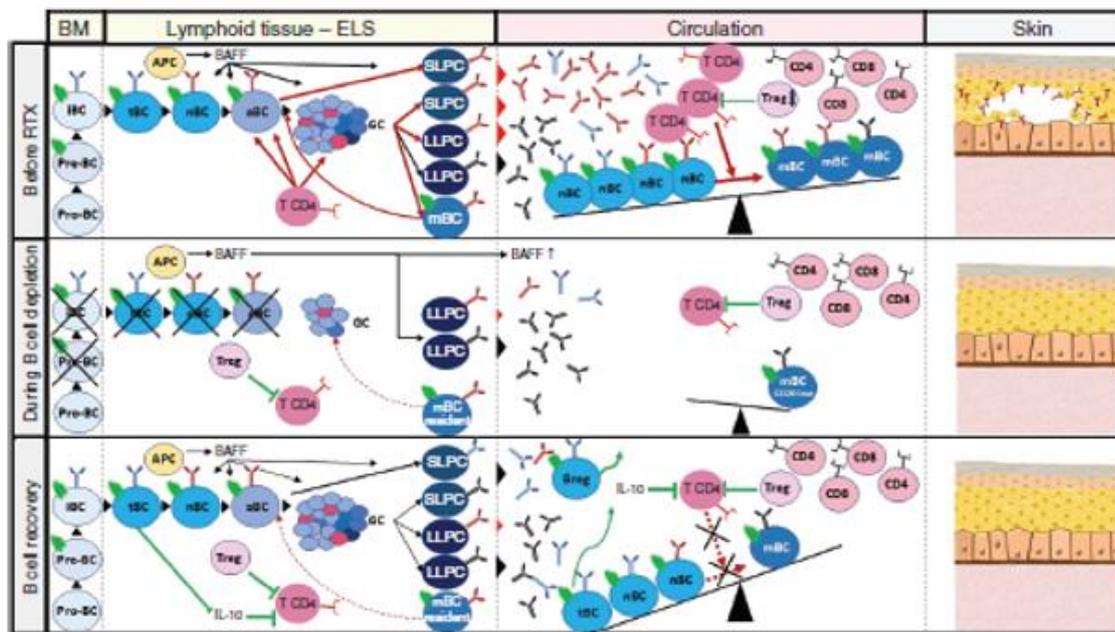


Figure 1. Schematic representation of immunological changes in long term remittent pemphigus patients after rituximab therapy. Immunological actors involved in the pathophysiology of pemphigus are represented before therapy, during B-cell depletion and after peripheral B-cell repopulation. B lymphocytes are schematized in different shades of blue depending on their state of maturation. T-cells are shown in shades of pink depending on their function. Autoreactive B-cells bear a red BCR and autoreactive CD4⁺ T-cells bear a red TCR. To illustrate changes in antibodies according to their autoreactive profile or not, total serum non anti-desmoglein IgM are in blue, non anti-desmoglein IgG antibodies are in black and anti-desmoglein autoreactive antibodies are in red. CD20 is in green on the surface of B-cells bearing it. APC: Antigen presenting cell; BC: B-cell (aBC: Activated B-cell); Breg: Regulatory B-cell; iBC: Immature B-cell; mBC: Memory B-cell; nBC: Naive B-cell; tBC: Transitional B-cell; BAFF: B-cell-activating factor; BM: Bone marrow; LLPC: Long-lived plasma cell; SLPC: Short-lived plasma cell.

LLPCs results in mild decrease or absence of decrease of total blood antibody levels [59,62]. Thus serum levels of anti-infectious Ab against tetanus toxoid and pneumococcal polysaccharide have been found to be unchanged [59,61].

The B-cell long-lasting depletion in peripheral blood predominantly affects MBCs and is related to B-cell death in blood stream but also to the decrease of germinal centers in lymph nodes and spleen, without affecting the bone marrow [11,61]. This depletion is however incomplete with persistence of naive and unswitched MBCs or CD20^{low} MBCs [63,64]. B-cell function in response to antigen is therefore impaired after RTX therapy and would alter vaccination efficacy, prompting to foresee the vaccinal calendar before administration. In mice, RTX was found to impair antigen-specific Ab isotype switching and IgG-subclass Ab responses to T-independent and T-dependent antigens [61]. Similar decrease response to recall antigens in patients treated with RTX was found [65]. However, in patients with auto-immune blistering diseases, without detectable preexisting influenza specific MBCs in peripheral blood and facing B-cell repopulation after RTX, influenza vaccination resulted in a robust humoral immune response of comparable magnitude, quality and repertoire breadth to that observed in vaccinated healthy controls [66]. The persistence of MBCs in lymphoid structures and the humoral response to antigen-recall highlight that some resident MBCs might escape RTX-mediated depletion in lymphoid tissues niches. Thus, some of these cells might be responsible of relapses in auto-immune diseases.

After RTX infusion, the decrease in serum autoreactive Abs is progressive for months [67]. Dsg-specific auto-Abs parallel the clinical evolution after infusion, suggesting that RTX effect is in relation with the depletion of mature CD20⁺ B-cells committed to differentiate into Ab-producing plasmablasts and questions the respective contribution of LLPCs and short-lived plasma cells in pemphigus pathogenesis [68].

In a schematic representation of RTX action on B-cells, auto reactive B cells clones and auto reactive Dsg-specific Abs would disappear in patients in complete remission whereas it would persist in recalcitrant or relapsing patients.

Long-term follow-up of auto reactive B-cells and Abs demonstrated a more complex regulation. In patients in remission, auto reactive B-cells were found in smaller amounts than in active patients, and with a greater proportion of IgM Dsg3⁺ cells than IgG Dsg3⁺ cells, in association with rearrangement in Ig repertoire that switched from oligoclonal to polyclonal profile (11). Accordingly, a significant decrease in the frequency of CD19⁺CD27⁺ memory autoreactive DSG-positive B-cells was observed in transcriptomic analysis after rituximab treatment in remitting patients (69). Since few circulating auto reactive B-cells were also found in healthy subjects, it suggested that the number of circulating Dsg3-specific auto reactive B cells might be correlated with the clinical response (11,69). In recalcitrant or relapsing patients, anti-Dsg3 B-cells clones were found to persist and epitope spreading was found to be rare (60,70). Thus, persistent resident auto reactive B-cell clones in lymphoid tissues might result in the reappearance of a pathological germinal center response after B-cell pool recovered and in the resumption of pathogenic auto-Ab production in relapsing patients; whereas in remitting patients, the ongoing maturation of new auto reactive B-cell clones might explain the predominance of IgM-Dsg3 B-cell clones with a restored polyclonal repertoire (11). RTX-induced changes in other partners regulating the immune balance might be at the forefront to control the clonal expansion of such remaining resident auto reactive B cells and to prevent the appearance of new B-cell clones secreting pathogenic auto-Abs.

Other immunological changes participating in restoring immune balance

B-cells play a key role in Ag presentation to T-cell. B-cell depletion induces a reduction of antigen presenting cells involved in processing and in the presentation of Ags to T-cells. RTX demonstrates no effect on the CD4⁺ or CD8⁺ T-cell number in periphery and T-cell function (59,71). Whereas no change in tetanus toxin-specific CD4⁺ Th-cells was described, RTX rapidly decreases auto reactive anti-Dsg3 CD4⁺ T_{H1} and T_{H2} cells indirectly through deprivation of B-cell stimulation (68). The autoreactive CD4⁺ T cell decline lasts approximately as long as the B cell depletion and the rate of autoreactive T cells correlated with auto-Ab titers and clinical activity (68,71). Whereas RTX did not affect T-follicular helpers or T-follicular regulatory cells in human lymph nodes (72), regulatory T lymphocytes (Treg) seem fewer in number in the peripheral blood of pemphigus patients at baseline compared with controls, with conflicting results concerning their evolution after therapy (73,74). A small series also showed that Treg decreased in comparison with healthy volunteers and suggested homing into the skin or lymph nodes (75).

In addition to the increase of CD19⁺CD27⁻ naive-B cell and the decrease of CD19⁺CD27⁺ MBCs resulting in long lasting change of naive/MBC ratio, patients in complete remission have an expansion of transitional B-cells and IL-10-secreting regulatory B-cells (B-reg) during B-cell repopulation (11). B-reg were previously found to decrease CD4⁺ T-cell effector responses and CD4⁺ T-cell help (76). Strikingly, these B-reg were found to consist mainly of transitional B-cells (11).

In summary the changes encountered by the actors of adaptative immunity might explain the almost complete disappearance of Dsg-specific circulating IgG⁺ B-cells and serum anti-Dsg Abs participating in the long-lasting therapeutic effect of RTX in remitted patients. Remaining Dsg-specific IgM⁺ B-cells might be related to the blockage of the IgM to IgG switch, due to the decrease of auto reactive T cells induced by the cytokinic environment changes and regulatory-B-cells through IL-10 secretion (11).

Relapse & maintenance

Whereas treatment failure with rituximab seems to be a rare event, pemphigus relapse after rituximab therapy has been well documented (11,35,36). Postulated mechanisms of relapse are numerous and include the following:

- Persisting memory and germinal B-cells in lymphoid tissues such as spleen and lymph nodes. The persistence of identical anti-Dsg3 clones after RTX therapy in a patient resistant to RTX supports this hypothesis (60).
- Remaining autoreactive CD4⁺ TH cells.
- Escape from immunological tolerance leading to the appearance of new lineages of IgG⁺ auto-Dsg B cells.
- Autoreactive LLPCs with persistent production of anti-Dsg auto-Ab.
- Human anti chimeric auto-Ab (HACA) to RTX, which were suggested to be associated with relapse and inefficiency in B-cell depletion (77). HACA with the potency to directly block the binding of RTX *in vitro* were found in pemphigus patients (9).
- Impaired antibody binding because of change in CD20 such as CD20 alternative transcript (D393-CD20), which was described in lymphoma but also in pemphigus (78); or biochemical changes in lipid raft signaling leading to RTX-mediated ADCC resistance (79).

- Downregulation of CD20, notably in some population CD27⁺ MBCs, which could impair RTX binding and thus immune effector cell recruitment or function.

In series with long-term outcome a relapse occurred in 60–100%, depending on concurrent treatment with ISA, schedule of RTX reinfusion or concurrent treatments decrease, within a mean time ranging from 6 to 24 months (43). Better outcomes with 80–90% of CR and possibly long-term remission were obtained with additional infusions in the 6 to 18 months period following the first cycle (40,43). In the Ritux 3 study, relapse had occurred in 24% of patients of the rituximab group with a maintenance protocol of 500 mg of rituximab at month 12 and 18, before 89% of patients of this group achieved CRoff at months 24 (10). Such reinfusion schedules were based on previous studies showing that up to 80% of pemphigus patients required additional infusions to prevent insufficient responses or relapses (46). In a recent large retrospective study with long-term outcome including 59 patients, 63% of patients relapsed but 95% achieved CR at some point with 1–4 cycles of RTX; long-term CRoff 36 months after the last infusion was estimated to be 27% (43).

Thus, a maintenance therapy with RTX after the first cycle seems to be required. In the literature, additional cycles of RTX were given in case of insufficient response or relapse whereas others adopted an empirically planned schedule of re-injections 6 months apart with progressive spacing for few years (33,36,40). Until recently, there was no consensus on the need of re-injections, nor the dosage regimen or the schedule to adopt, the better evaluation of systematic re-injections regimen originating from the Ritux 3 study including 90 patients who received 500 mg at months 12 and 18 (10). Recently, the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV) published new guidelines on the management of pemphigus, suggesting a management algorithm in case of failure (no disease control at 3–4 weeks) to rituximab and maintenance protocols based on clinical and biological parameters (53).

One of the main current objective is to better define the schedule for maintenance therapy to prevent unnecessary infusions and adverse events, and to reduce both costs and disease burden. As proposed by the EADV guidelines, it could be based on targeting patients at risk to relapse by the identification and monitoring of clinical or biological predictive markers.

Biomarkers

Some markers were reported to be associated with better outcomes or predictive of relapse. Notably, the monitoring of B-cell and T-cell counts, or anti-Dsg Abs and BAFF, might be useful. Indeed, in meta-analyses and studies with long-term follow-up, RTX efficacy did not depend on the type of pemphigus, the duration of pemphigus evolution or the age at diagnosis (43,48).

Poor clinical response to RTX in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients was associated with B-cell subsets resistant to depletion, notably high numbers or frequencies of switched MBCs (80). This resistance might result from lower expression levels of CD20 by switched MBCs compared with unswitched MBCs (16,81). In pemphigus, low B-cells number after depletion, rapid disappearance of B-cells and longer time to repopulate seem associated with a lower relapse rate (82). Moreover, long-term remission has been associated with an increased ratio of naive/MBCs, high rates of CD38⁺CD24⁺ transitional B-cells and IL-10 producing B-cell after peripheral blood repopulation and with the absence of Dsg3-IgG⁺ B-cell (59). Notably, the persistence of autoreactive B-cell clones identical to those present before RTX therapy was reported in recalcitrant pemphigus patients, whereas their disappearance and the restauration of BCR repertoire diversity were shown in remitting patients (59,60). Recently, in treated pemphigus patients, higher number of Dsg3-specific MBCs were however found in remitting patients receiving minimal immunosuppressive therapies compared with patients with relapsing disease or partial remission receiving moderate immunosuppressive therapies. It suggested that systemic immunosuppressive therapies impact the frequency of circulating autoreactive B-cells, notably, highest rates were in remitting patients that underwent rituximab therapy (83). Thus, both Dsg3-specific B-cells subpopulation and their clonality after RTX therapy in PV patients might be monitored in larger studies to confirm their benefit as predictive factors of relapse or remission.

CD4⁺ T-cell count was also shown to inversely correlate with the rate of relapse in the multivariate analysis of a retrospective study involving 62 pemphigus patients who had received 99 cycles of RTX (82).

Serum BAFF decrease has been associated with B-cells repopulation and thus with clinical relapse (84). Serologic detection of Dsg-specific Abs can be monitored at baseline and after RTX therapy and demonstrate potential for predicting response to RTX (85,86). Baseline Dsg-specific Abs titers were associated with better outcomes considering CRoff in a retrospective study (43). Baseline titer of serum anti-Dsg1 was also correlated with the time to relapse after one cycle of RTX in another prospective study (39). After RTX therapy, clinical remission usually parallels anti-Dsg1

and anti-Dsg3 auto-antibodies titers [59,68,87]. In a retrospective study, Albers *et al.* demonstrated in multivariate analysis that positive anti-Dsg1 and anti-Dsg3 titers were predictive of relapse, their positivity being responsible for 5.7- and 8.0-fold of relapse rate, respectively [82]. However anti-Dsg Abs could remain detectable in about 16–40% of patients even after clinical remission [87,88]. This discrepancy might be explained by differences in the specificity for pathogenic or non-pathogenic epitopes of the Dsg ectodomain [89,90]. Monitoring Ab response against specific Dsg subdomains could be of better profit than monitoring of total anti-Dsg levels, notably for anti-Dsg3 that have been found less predictive for clinical changes than anti-Dsg1 [87].

Finally, patients with HACA were once reported to have worse clinical response and more relapse but this was not confirmed in the post-hoc analysis of the Ritux 3 study where patients with HACA (59%) had no decrease in CRoff rate at 2 years in this sub-group [50,77].

Thus, these biological markers might be indicators of patients who need RTX maintenance therapy. The EADV guidelines recently suggested protocols of maintenance infusion in patients with positive anti-Dsg antibodies titers [53]. The application of these guidelines in Europe will probably lead to a homogenization of therapeutic practices; however, other strategies of maintenance taking into account other markers should continue to be evaluated.

Rituximab-related adverse events

Rituximab-related mortality was reported to be higher in patients with auto-immune blistering diseases than in other auto-immune diseases [91], whereas severe adverse events (SAE) related to RTX seemed to be less frequent in auto-immune disease than in B-cell malignancies. SAE of RTX in pemphigus have a rare occurrence since their frequency was estimated in a meta-analysis at 4.8 and 2.1% with LP and RAP regimens respectively whereas death occurred in 1.6 and 1.0% [46].

Besides, direct attribution of SAE to RTX is made difficult considering the concurrent use of CS and usually ISA in pemphigus patients (Table 1). Patients with concomitant use of CS and ISA with RTX therapy account for 59 and 69% of patients respectively in LP and RAP, whereas those with no CS or ISA were respectively 3 and 21% [46]. Notably, hematological and infectious events are well known side effects of such concomitant therapies. SAE seem to be increased in patients with concomitant immunosuppressive treatments compare to RTX alone, but also in individuals with underlying malignancy, in children or those older than 60 years old [91]. Some SAE with fatal evolution such as gastric perforation might be attributable to CS therapy rather than to RTX [26].

RTX-induced adverse events could be separated into short term side effects occurring during the infusion or in the next days and delayed side effects related to immunosuppression (Figure 2). It requires to carefully check for contraindication before administration, notably for pregnancy or breastfeeding because studies demonstrating the RTX safety in such patients are lacking and transient B-cell lymphocyte depletion in infants exposed to rituximab in utero has been reported [92]. RTX is usually contraindicated in active infectious diseases (HBV, HCV, HIV and sepsis), or uncontrolled cardiopathy [93].

Short term side effects

Short term side effects encompass infusion-related reactions (IRR), namely: immediate sensitivity reactions (hypotension, fever, chills, headache, weakness, nausea, pruritus, bronchospasm, urticaria and rash) in relation with anaphylactic reaction or cytokine release syndrome. These IRR manifest usually within 2 h after the beginning of the infusion, especially after the first two ones. The frequency decreases with subsequent infusion and rarely require intensive care [94].

In B-cell malignancies, IRR were reported in >80% of patients but grade 3 or 4 IRR occur in only 10% of patients during the first infusion of RTX and are rarely lethal [95]. In a retrospective study of 92 pemphigus patients, IRR were described in 61% during the first infusion [36]. IRR are generally mild-to-moderate in pemphigus because cytokine release is thought to be lower in comparison to B-cell lymphoma. Notably, no severe cytokine release syndrome has been reported in pemphigus, but one death in relation with an acute respiratory distress syndrome has been described [96].

Besides, cardiac SAE, such as arrhythmia, have been reported with RTX therapy in less than 10% in B-cell lymphoma and rarely in pemphigus [27]. These reactions require to administrate RTX under close supervision with access to full resuscitation facilities [93]. IRR can be prevented by a slow infusion rate during the first infusion, with progressive increase in flow rate, as well as premedication before the infusion with analgesics (acetaminophen), antihistamines and glucocorticoids [93]. IRR can be smoothed by temporarily stopping the infusion, or re-

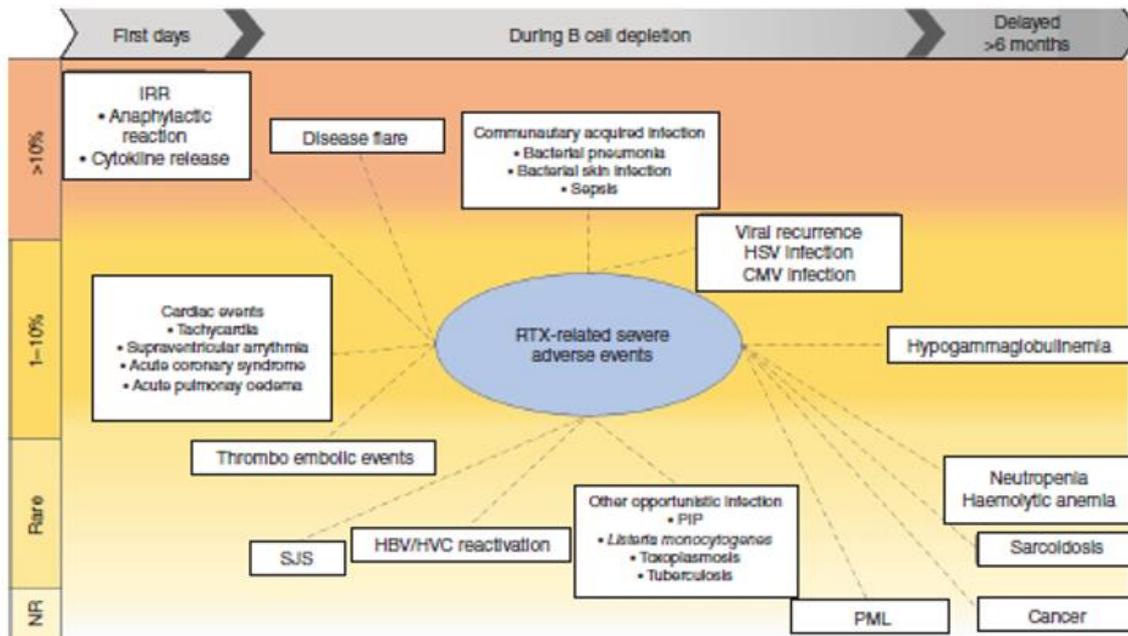


Figure 2. Rituximab-related adverse events in pemphigus: schematic presentation according frequency and time. CMV: Cytomegalovirus; HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus; HSV: Herpes simplex virus; IRR: Infusion-related reaction; NR: Non reported; PJP: *Pneumocystis jirovecii pneumoniae*; PML: Progressive multifocal leukoencephalitis; RTX: Rituximab; SJS: Stevens-Johnson's syndrome.

administration of premedication treatments, and after improvement by continuing with half the previous infusion rate. In case of severe reaction, the infusion must be stopped.

Delayed side effects

Paradoxical disease flare after RTX infusion responsible for a rapid disease worsening is increasingly reported in pemphigus patients [30,97]. When dosed, serum concentrations of anti-Dsg3 IgG auto-antibodies were found to be increased during the flare [97]. Its prevalence was estimated at 1.38 per patient and 0.38 per cycle in a small retrospective study [98]. Such flares are usually successfully managed by increasing CS dosage or by IVIG infusions and do not seem to be associated with the absence of remission [30,98]. Such flares might be prevented in most of cases by the concomitant administration of CS, as suggested by a striking incidence of 47.1% reported in a series of 18 pemphigus patients treated with RTX in the absence of daily CS therapy [74].

Although miscellaneous cases of other rare complications were reported, RTX-related delayed adverse events mostly include infections (Table 1). A German multicenter registry of inflammatory disease was used in 2018 to explore adverse events during the off-label use of biologic therapies, including 70% of RTX treatment and 5.8% of pemphigus patients [99]. In 311 patients, most SAE were infectious events [99]. Although RTX may not impair significantly humoral memory immunity, studies reported infections as main SAE after RTX therapy with various rates of infectious events up to 40% with fatal evolution up to 3% [50,100]. However, the risk of infectious events was higher in the CS alone arm than in the RTX + CS arm in the Ritux 3 study involving 90 pemphigus patients, and none in the latter requires the discontinuation of RTX [10]. The cumulative dose of RTX was not reported to increase the infectious risk, but it remains to be confirm in cohorts with long-term follow-up after multiple infusions over years [100]. Thus, infections seem to rather be related to concomitant therapies directly impairing cellular immunity, whereas RTX was not proved to change CD4⁺/CD8⁺ T-cell circulating numbers [28,100]. However, B-cells having a role in T cells activation as antigen presenting cells and cytokine production, B-cells are necessary for an optimal CD4⁺ memory response, which could partially explain the susceptibility to bacterial infection and opportunistic infections after RTX therapy.

Most of infectious SAE were bacterial infections, usually upper/lower respiratory tract or skin infection and septicemia responsible for fatal evolution remained a rare event [6,31,43]. *Pneumocystis jirovecii pneumoniae* (PJP) have

rarely been described in pemphigus patients receiving RTX. To date, seven cases including two deaths have been published in patients receiving concomitant ISA, rising the hypothesis that PJP was more attributable to ISA [50,101]. Although an increase of the risk of PJP after RTX infection is still debated, PJP prophylaxis with trimethoprim-sulfamethoxazole is recommended for 6 months after infusions in some immunocompromised patients (lymphoma and ANCA vasculitis). However PJP prophylaxis is not necessary in pemphigus because estimated prevalence is thought to be too low to support the risk of drug reaction with trimethoprim-sulfamethoxazole [102].

Few uncommon infections of bacterial or parasitic origins in pemphigus patients, receiving RTX have to be highlighted regarding their possible fatal issue despite their extreme rarity. It includes a brain abscess due to *Listeria monocytogenes*, infective endocarditis and acute toxoplasmosis infection [103–105]. Besides, tuberculosis reactivation is theoretically more susceptible.

Viral reactivations have frequently been described, sometimes rapidly following the infusion. They are mostly due to HSV, responsible for skin symptoms or keratitis, but also to opportunistic CMV [30,31,106]. No serological screening or antiviral prophylaxis is recommended although some teams have used acyclovir prophylaxis [33]. Outside of pemphigus, severe viral reactivation had rarely been reported such as enteroviral meningoencephalitis [107]. Some viruses have to be closely monitored because particular concerns have been raised in other diseases regarding the risk of reactivation or worsening after RTX therapy. This is the case for HBV, HCV, HIV 1 and 2, of which screening is required prior RTX therapy to reduce the risk of viral reactivation. For HCV, replication and flares were reported with RTX in patients with lymphoma [108]. RTX-containing chemotherapy in patients with cancer was reported to be a significant risk factor related to the acute exacerbation [109]. Nevertheless, only miscellaneous cases were reported in auto-immune diseases and none with pemphigus. For HBV, immunosuppressive therapies including RTX may result in the loss of immune control over the virus with subsequent HBV replication leading to liver injuries [110]. However, RTX was reported to have been safely administered in severe pemphigus patients with HBV and HCV infections with concomitant antiviral drug administration [111]. Multidisciplinary decision, close monitoring and prophylactic treatment against viral reactivation are requested in patients with hepatitis B or C [112]. Similarly, RTX was safely administered to an HIV patient with severe pemphigus and concomitant use of anti retroviral therapy, whereas the patient previously had decrease of CD4⁺ T-cell and increase of viral load because of previously use of conventional ISA [113].

Progressive multifocal leukoencephalopathy, due to JC poliovirus replication, is a very rare complication in all indications of RTX therapy nowadays but no case has been described in pemphigus patients [114]. Continuous monitoring is nevertheless mandated because progressive multifocal leukoencephalopathy was previously described in lymphoproliferative disorders. The risk is possibly greater when combined with ISA or in diseases that are responsible for CD4⁺ T-cell depletion and hypogammaglobulinemia [114].

Hematological disturbances have rarely been reported in pemphigus. Although, a transient drop of IgM serum level was described after RTX infusion, total Ig serum level has found to be unchanged in pemphigus patients [59]. Nevertheless, experience of other diseases supports a close follow-up in immunoglobulin levels because hypogammaglobulinemia could be underdiagnosed, exposing to an increase risk of infection [115]. Late onset neutropenia in the year following RTX has variable prevalence depending on the conditions. It is a rare 6 months-delayed event with short evolution disappearing spontaneously within days in pemphigus [116].

Thrombo-embolic events were reported in the course of pemphigus patients treated with RTX [31,117]. Whereas thromboembolic risk was described to be increased in pemphigus, no clues indicate if those events were attributable to RTX or not [118].

Other rare SAEs reported in pemphigus patients encompass hemolytic anemia, toxic epidermal necrolysis and sarcoidosis [119–121]. Despite it was reported during tumor lysis syndrome in lymphoproliferative disorders, renal dysfunction was not seen in pemphigus. Interstitial lung disease after adverse pulmonary reaction and serum thickness were not described in pemphigus patients, although serum thickness was more frequently observed in auto-immune diseases than in hematological disorders with RTX therapy [122]. Finally, despite being common, HACA do not seem to be associated with a high incidence of serum sickness in pemphigus [50].

Conclusion

RTX revolutionized the therapeutic landscape in pemphigus achieving major improvements in outcomes considering the remission rates and the CS-sparing effect. Alongside, its use brought a better understanding in immunological actors involved in the active and remission states of the disease. However, the precise mechanisms responsible for the initial tolerance break leading to the development of auto immunity and onset of pemphigus remain to be

elucidated in order to intervene earlier in the disease course. At the present time, efforts must also be directed to define more accurate predictive markers which will permit re-injection regimens based on individual factors in order to achieve complete remission, and to limit relapses, adverse effects and costs.

Future perspective

Nevertheless since some pemphigus patients will not respond to RTX therapy and others will need repeated additional infusions to achieve CR, new therapies are needed in pemphigus. Second and third generation of anti-CD20 monoclonal antibodies were developed to offer easier ways of administration in order to reduce the health system costs and to improve B-cell depletion. Subcutaneous administration of ofatumumab showed promising results but trial was prematurely terminated by the sponsor [123]. Ofatumumab and veltuzumab, another type I anti-CD20 monoclonal Ab, were reported to be successfully used in case reports in two and one pemphigus patients respectively [124,125]. Engineered to obtain improved B-cell depletion through high-binding affinity and increase ADCC, type II obinutuzumab has never been used in pemphigus so far [126]. Other new therapeutics in pemphigus aim to inhibit B-cell survival factors. Notably, one Bruton Tyrosine Kinase inhibitor (BTKi) and one anti-BAFF-receptor monoclonal antibody are currently evaluated respectively in Phase III (NCT03762265) and Phase II (NCT01930175) studies [127,128]. The BTKi (riltabrutinib, formerly PRN1008) has shown promising results in a Phase II trial. Another therapeutic approach consisting in the selective depletion of Dsg-3 auto reactive B cells in pemphigus using bioengineered chimeric auto-antibody receptor T cells (CAAR T-cells) will be investigated in a Phase I trial (NCT04422912) [129]. Rather than targeting auto-Ab producing B-cells, other therapeutics aim at reducing pathogenic Dsg-specific auto-Ab thanks to the neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) inhibition (SYNT001 or ARGX-113) that demonstrated promising results in Phase I–II studies in pemphigus [130,131]. Furthermore, immunological changes after RTX therapy straight the importance of regulatory cells in the maintenance of clinical remission encouraging to investigate autologous polyclonal regulatory T-cells in pemphigus (NCT03239470) [132]. Thus the future will certainly provide new therapeutic options in pemphigus patients. Their place in the therapeutic arsenal will require to compare them in head-to-head trials to rituximab and also to determine if they can be used in association with RTX.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/imt-2020-0189

Author contributions

All authors contributed to the conception and interpretation of data for the work, drafted the work or revised it critically for important intellectual content, and approved the final version to be published. They agreed to be accountable for all aspects of the work. G Bohelay was also involved in the acquisition of data for the work.

Acknowledgments

We thank the Collège des Enseignants en Dermatologie de France (CEDEF) for its support.

Financial & competing interests disclosure

F Caux was a consultant for Principia Biopharma Inc, and Pierre Fabre Dermatologie. G Bohelay and P Musette have no financial and conflict of interest disclosures. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Rituximab

- Rituximab is an anti-CD20 monoclonal antibody employed to deplete B-cells in hematological malignancies and auto-immune conditions.

Pemphigus patients treated with rituximab

- Rituximab has been used off-label since 2001 in pemphigus, an auto-immune blistering disease which is a paradigm of B-cell driven auto-immune disease with auto reactive B-cells responsible for the production of pathogenic anti desmoglein 1 and 3 auto-antibodies.
- Until 2017, rituximab use in pemphigus relied on open non randomized studies suggesting its clinical efficacy to achieve complete remission and sparing corticosteroids (CS) and immunosuppressants in recalcitrant pemphigus patients.
- In 2017, a Phase III randomized controlled trial (Ritux 3 study) brought high level of evidence for the use of rituximab in association with short-term prednisone in the first-line treatment of moderate-to-severe newly diagnosed pemphigus patients. The 'rituximab plus CS' arm demonstrated to be superior to the 'CS alone' arm to achieve complete remission (89 vs 34% of complete remission off therapy at 2 years of follow-up) allowing to significantly decrease the cumulative prednisone dose and adverse events.
- Rituximab recently was approved by the US FDA and the EMA in moderate-to-severe pemphigus based on the Ritux 3 study. Rituximab is now a first-line treatment for pemphigus.

Immunological effects of rituximab

- Studies investigating rituximab in pemphigus brought important knowledge in the changes of immunological actors achieved after therapy.
- Rituximab induces a rapid B-cell depletion responsible for a progressive decrease in anti desmoglein 1 and 3 auto-antibodies because of the auto reactive B-cell clones death and the arrest of ongoing maturation of new auto reactive B-cell clones.
- When B-cells recover, complete remission was shown to be associated with changes favoring immunological tolerance (increase ratio of naive/memory B-cells, increase transitional B-cells and regulatory B-cells producing IL-10, decrease in auto reactive CD4⁺ T cells) which might participate in the blockage of IgM to IgG switch responsible for the persistence of desmoglein-specific IgM⁺ B-cells without new production of pathogenic desmoglein-specific IgG⁺ B-cells.

Relapse & maintenance

- Forty percent of patients with pemphigus will require more than one cycle of treatment to achieve complete remission off therapy. Biomarkers accessible in daily practice will be useful to identify pemphigus patients that will require additional infusions.

Biomarkers

- Notably, monitoring of B-cell and CD4⁺ T-cell counts, anti-Dsg Abs and BAFF levels, might be useful.

Rituximab-related adverse events

- Rituximab-related adverse events in pemphigus patients comprise infusion related reactions and bacterial or viral infections.

Future perspective

- As approximatively 10–15% of patients will not benefit from rituximab or may have contraindication, new therapies to treat pemphigus are mandatory. Their use in replacement or in association with rituximab will have to be investigated.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

- ▶ 1. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet* 394(10201), 882–894 (2019).
- ▶ 2. 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.* 306(20), 1189–1196 (1982).
- ▶ 3. 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.* 105(5), 625–631 (2000).
- ▶ 4. Ahmed AR, Carrozzo M, Caux F *et al.* Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. *Exp. Dermatol.* 25(11), 839–846 (2016).
- ▶ 5. 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.* 29(3), 405–414 (2015).
- ▶ 6. Joly P, Mouquet H, Roujeau J-C *et al.* A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N. Engl. J. Med.* 357(6), 545–552 (2007).

- **First non randomized prospective study with more than 2 years of follow-up investigating the efficacy of a single cycle of rituximab in pemphigus.**
- ▶ 7. Butler LA, Tam CS, Seymour JF. Dancing partners at the ball: rational selection of next generation anti-CD20 antibodies for combination therapy of chronic lymphocytic leukemia in the novel agents era. *Blood Rev.* 31(5), 318–327 (2017).
- ▶ 8. Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner MR. Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *N. Engl. J. Med.* 355(17), 1772–1779 (2006).
- ▶ 9. Lunardon L, Tsai KJ, Probert KJ *et al.* Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients. *Arch. Dermatol.* 148(9), 1031–1036 (2012).
- ▶ 10. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C *et al.* First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet* 389(10083), 2031–2040 (2017).
- **Randomized prospective study achieving high-level of evidence and demonstrating the efficacy of rituximab in first line for the treatment of pemphigus.**
- ▶ 11. 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.* 5(175), 175ra30 (2013).
- **Study in pemphigus patients with long-term follow-up demonstrating changes in B-cell populations associated with complete response.**
- ▶ 12. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M *et al.* Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* 16(1), 119–129 (2004).
- ▶ 13. Unruh TL, Li H, Mutch CM *et al.* Cholesterol depletion inhibits src family kinase-dependent calcium mobilization and apoptosis induced by rituximab crosslinking. *Immunology* 116(2), 223–232 (2005).
- ▶ 14. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6(4), 443–446 (2000).
- ▶ 15. Golay J, Introna M. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of *in vitro* and *in vivo* assays. *Arch. Biochem. Biophys.* 526(2), 146–153 (2012).
- ▶ 16. Reddy V, Cambridge G, Isenberg DA, Glennie MJ, Cragg MS, Leandro M. Internalization of rituximab and the efficiency of B Cell depletion in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 67(8), 2046–2055 (2015).
- ▶ 17. Ruysen-Witrand A, Rouanet S, Combe B *et al.* Fcγ receptor type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Ann. Rheum. Dis.* 71(6), 875–877 (2012).
- ▶ 18. Gaipl US, Voll RE, Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M. Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 4(4), 189–194 (2005).
- ▶ 19. Heizmann M, Itin P, Wernli M, Borradori L, Bargetzi MJ. Successful treatment of paraneoplastic pemphigus in follicular NHL with rituximab: report of a case and review of treatment for paraneoplastic pemphigus in NHL and CLL. *Am. J. Hematol.* 66(2), 142–144 (2001).
- ▶ 20. Salopek TG, Logsetty S, Tredget EE. Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) for the treatment of recalcitrant, life-threatening pemphigus vulgaris with implications in the pathogenesis of the disorder. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47(5), 785–788 (2002).
- ▶ 21. Herrmann G, Hunzelmann N, Engert A. Treatment of pemphigus vulgaris with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). *Br. J. Dermatol.* 148(3), 602–603 (2003).
- ▶ 22. Morrison LH. Therapy of refractory pemphigus vulgaris with monoclonal anti-CD20 antibody (rituximab). *J. Am. Acad. Dermatol.* 51(5), 817–819 (2004).
- ▶ 23. Arin MJ, Engert A, Krieg T, Hunzelmann N. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in the treatment of pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 153(3), 620–625 (2005).
- ▶ 24. Shimanovich I, Nitschke M, Rose C, Grabbe J, Zillikens D. Treatment of severe pemphigus with protein A immunoadsorption, rituximab and intravenous immunoglobulins. *Br. J. Dermatol.* 158(2), 382–388 (2008).
- ▶ 25. Leuci S, Levine D, Zhang J, Razzaque Ahmed A. Response in patients with pemphigus vulgaris to rituximab therapy. Basis of the biology of B cells. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 144(4), 379–409 (2009).
- ▶ 26. 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.* 165(3), 646–651 (2011).
- ▶ 27. Horváth B, Huizinga J, Pas HH, Mukler AB, Jonkman MF. Low-dose rituximab is effective in pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 166(2), 405–412 (2012).
- ▶ 28. Cianchini G, Lupi F, Masini C, Corona R, Puddu P, De Pittà 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.* 67(4), 617–622 (2012).
- ▶ 29. Kanwar AJ, Tsuruta D, Vinay K *et al.* Efficacy and safety of rituximab treatment in Indian pemphigus patients. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 27(1), e17–23 (2013).

- ▶ 30. 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.* 68(3), 404–411 (2013).
- ▶ 31. Balighi K, Kamran B, Daneshpazhooh M *et al.* Adjuvant rituximab in the treatment of pemphigus vulgaris: a Phase II clinical trial. *Int. J. Dermatol.* 52(7), 862–867 (2013).
- ▶ 32. Cho HH, Jin S-P, Chung JH. Clinical experiences of different dosing schedules of rituximab in pemphigus with various disease severities. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 28(2), 186–191 (2014).
- ▶ 33. Gregoriou S, Giatrakou S, Theodoropoulos K *et al.* Pilot study of 19 patients with severe pemphigus: prophylactic treatment with rituximab does not appear to be beneficial. *Dermatology* 228(2), 158–165 (2014).
- ▶ 34. Vinay K, Kanwar AJ, Sawatkar GU, Dogra S, Ishii N, Hashimoto T. Successful use of rituximab in the treatment of childhood and juvenile pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 71(4), 669–675 (2014).
- ▶ 35. Cho Y-T, Lee F-Y, Chu C-Y, Wang L-F. First-line combination therapy with rituximab and corticosteroids is effective and safe for pemphigus. *Acta Derm. Venereol.* 94(4), 472–473 (2014).
- ▶ 36. Heelan K, Al-Mohammed F, Smith MJ *et al.* Durable remission of pemphigus with a fixed-dose rituximab protocol. *JAMA Dermatol.* 150(7), 703–708 (2014).
- ▶ 37. 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.* 151(2), 200–203 (2015).
- ▶ 38. 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.* 34, 25–31 (2016).
- ▶ 39. Saleh MA. A prospective study comparing patients with early and late relapsing pemphigus treated with rituximab. *J. Am. Acad. Dermatol.* 79(1), 97–103 (2018).
- ▶ 40. 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.* 154(3), 363–365 (2018).
- ▶ 41. Vinay K, Cazzaniga S, Amber KT, Feldmeyer L, Naldi L, Borradori L. Rituximab as first-line adjuvant therapy for pemphigus: retrospective analysis of long-term outcomes at a single center. *J. Am. Acad. Dermatol.* 78(4), 806–808 (2018).
- ▶ 42. Russo I, Miozzo S, Saponeri A, Alaibac M. Ultra-low dose rituximab for refractory pemphigus vulgaris: a pilot study. *Experts. Opin. Biol. Ther.* 20(6), 673–678 (2020).
43. Shimanovich I, Baumann T, Schmidt E, Zillikens D, Hammers CM. Long-term outcomes of rituximab therapy in pemphigus. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 4 may 2020 doi: 10.1111/jdv.16561 [Epub ahead of print].
- ▶ 44. Toosi R, Mahmoudi H, Balighi K *et al.* Efficacy and safety of biosimilar rituximab in patients with pemphigus vulgaris: a prospective observational study. *J. Dermatol. Treat* 1–8 (2019).
- ▶ 45. Kanwar AJ, Vinay K, Sawatkar GU *et al.* Clinical and immunological outcomes of high- and low-dose rituximab treatments in patients with pemphigus: a randomized, comparative, observer-blinded study. *Br. J. Dermatol.* 170(6), 1341–1349 (2014).
- ▶ 46. Ahmed AR, Shetty S. A comprehensive analysis of treatment outcomes in patients with pemphigus vulgaris treated with rituximab. *Autoimmun. Rev.* 14(4), 323–331 (2015).
- ▶ 47. Wang H-H, Liu C-W, Li Y-C, Huang Y-C. Efficacy of rituximab for pemphigus: a systematic review and meta-analysis of different regimens. *Acta Derm. Venereol.* 95(8), 928–932 (2015).
- ▶ 48. Amber KT, Hertl M. An assessment of treatment history and its association with clinical outcomes and relapse in 155 pemphigus patients with response to a single cycle of rituximab. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 29(4), 777–782 (2015).
- ▶ 49. Kianfar N, Dasdar S, Mahmoudi H *et al.* Rituximab in childhood and juvenile autoimmune bullous diseases as first-line and second-line treatment: a case series of 13 patients. *J. Dermatolog. Treat.* 7, 1–6 (2020).
- ▶ 50. Chen DM, Oduyungbo A, Cainady E *et al.* Rituximab is an effective treatment in patients with pemphigus vulgaris and demonstrates a steroid-sparing effect. *Br. J. Dermatol.* 182(5), 1111–1119 (2020).
- ▶ 51. Murrell DF, Peña S, Joly P *et al.* Diagnosis and management of pemphigus: recommendations of an international panel of experts. *J. Am. Acad. Dermatol.* 82(3), 575–585 (2020).
- ▶ 52. Murrell DF, Sprecher E. Rituximab and short-course prednisone as the new gold standard for new-onset pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Br. J. Dermatol.* 177(5), 1143–1144 (2017).
53. Joly P, Horwath B, Patsatsi A *et al.* Updated S2K guidelines on the management of pemphigus vulgaris and foliaceus initiated by the european academy of dermatology and venereology (EADV). *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* (2020) doi:10.1111/jdv.16752 (Epub ahead of print).
- **European guidelines for the treatment of pemphigus patients suggesting maintenance dose and schedule for rituximab reinfusion according to clinical and biological markers.**
- ▶ 54. Gupta A, Sharma YK, Bhawalkar JS, Kothari P, Kharat R, Patil A. Intralesional rituximab salvages refractory scalp lesions in a case of pemphigus vulgaris. *Dermatol. Ther.* 33(1), e13154 (2020).

- ▶ 55. Vinay K, Kanwar AJ, Mittal A, Dogra S, Minz RW, Hashimoto T. Intralesional rituximab in the treatment of refractory oral pemphigus vulgaris. *JAMA Dermatol.* 151(8), 878–882 (2015).
- ▶ 56. Irají F, Danesh F, Faghíhi G *et al.* Comparison between the efficacy of intralesional rituximab versus intralesional triamcinolone in the treatment refractory Pemphigus Vulgaris lesions: a randomized clinical trial. *Int. Immunopharmacol.* 73, 94–97 (2019).
- ▶ 57. Yuan H, Zhou S, Liu Z *et al.* Pivotal role of lesional and perilesional T/B lymphocytes in pemphigus pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 137(11), 2362–2370 (2017).
- ▶ 58. Zhou S, Liu Z, Yuan H *et al.* Autoreactive B cell differentiation in diffuse ectopic lymphoid-like structures of inflamed pemphigus lesions. *J. Invest. Dermatol.* 140(2), 309–318 (2020).
- ▶ 59. Mouquet H, Musette P, Gougeon M-L *et al.* B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. *J. Invest. Dermatol.* 128(12), 2859–2869 (2008).
- **Study demonstrates the changes in B-cell count, B-cell phenotype, anti-Dsg auto-antibodies and Ig repertoire in pemphigus patients in long-lasting remission after rituximab.**
- ▶ 60. Hammers CM, Chen J, Lin C *et al.* Persistence of anti-desmoglein 3 IgG+ B-cell clones in pemphigus patients over years. *J. Invest. Dermatol.* 135(3), 742–749 (2015).
- ▶ 61. DiLillo DJ, Harnaguchi Y, Ueda Y *et al.* Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol.* 180(1), 361–371 (2008).
- ▶ 62. Feldman RJ, Christen WG, Ahmed AR. Comparison of immunological parameters in patients with pemphigus vulgaris following rituximab and IVIG therapy. *Br. J. Dermatol.* 166(3), 511–517 (2012).
- ▶ 63. Sutter JA, Kwan-Morley J, Dunham J *et al.* A longitudinal analysis of SLE patients treated with rituximab (anti-CD20): factors associated with B lymphocyte recovery. *Clin. Immunol.* 126(3), 282–290 (2008).
- ▶ 64. Thauinat O, Patey N, Gautreau C *et al.* B cell survival in intra-graft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation* 85(11), 1648–1653 (2008).
- ▶ 65. van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MHJ. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood* 100(6), 2257–2259 (2002).
- ▶ 66. Cho A, Bradley B, Kauffman R *et al.* Robust memory responses against influenza vaccination in pemphigus patients previously treated with rituximab. *JCI Insight* 2(12), e93222 (2017).
- ▶ 67. 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.* 129(9), 2202–2210 (2009).
- ▶ 68. Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 128(12), 2850–2858 (2008).
- **Study shows auto reactive T-cell decrease after rituximab in pemphigus patients.**
- ▶ 69. Hébert V, Petit M, Maho-Vaillant M *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.* 10, 1794 (2019).
- ▶ 70. Ohyama B, Nishifujii K, Chan PT *et al.* Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large-scale longitudinal study using desmoglein 2-based swapped molecules. *J. Invest. Dermatol.* 132(4), 1158–1168 (2012).
- ▶ 71. Leshem YA, David M, Hodak E *et al.* A prospective study on clinical response and cell-mediated immunity of pemphigus patients treated with rituximab. *Arch. Dermatol. Res.* 306(1), 67–74 (2014).
- ▶ 72. Wallin EF, Jolly EC, Suchánek O *et al.* Human T-follicular helper and T-follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers. *Blood* 124(17), 2666–2674 (2014).
- ▶ 73. Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A *et al.* CD4+CD25 high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. *Dermatology* 214(3), 210–220 (2007).
- ▶ 74. Bhattacharjee R, De D, Handa S, Minz RW, Saikia B, Joshi N. Assessment of the effects of rituximab monotherapy on different subsets of circulating T-regulatory cells and clinical disease severity in severe pemphigus vulgaris. *Dermatology* 232(5), 572–577 (2016).
- ▶ 75. El-Zawahry B, Bassiouny D, Hegazy R *et al.* Rituximab treatment in pemphigus vulgaris: effect on circulating Tregs. *Arch. Dermatol. Res.* 309(7), 551–556 (2017).
- ▶ 76. Bouaziz J-D, Calbo S, Maho-Vaillant M *et al.* IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 40(10), 2686–2691 (2010).
- ▶ 77. Schmidt E, Hennig K, Mengede C, Zillikens D, Kromminga A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clin. Immunol.* 132(3), 334–341 (2009).
- ▶ 78. Gamonet C, Ferrand C, Colliou N *et al.* Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus. *Exp. Dermatol.* 23(1), 66–67 (2014).
- ▶ 79. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24(2), 203–216 (2011).
- ▶ 80. Leandro MJ. B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Res. Ther.* 15(Suppl. 1), S3 (2013).

- ▶ 81. Kamburova EG, Koenen HJPM, Borgman KJE, ten Berge IJ, Joosten I, Hilbrands LB. A single dose of rituximab does not deplete B cells in secondary lymphoid organs but alters phenotype and function. *Am. J. Transplant.* 13(6), 1503–1511 (2013).
- ▶ 82. 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.* 77(6), 1074–1082 (2017).
- ▶ 83. Pollmann R, Walter E, Schmidt T *et al.* Identification of autoreactive B cell subpopulations in peripheral blood of autoimmune patients with pemphigus vulgaris. *Front. Immunol.* 10, 1375 (2019).
- ▶ 84. Cambridge G, Perry HC, L Nogueira *et al.* The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *J. Autoimmun.* 50, 67–76 (2014).
- ▶ 85. Daneshpazhoo M, Zafarmand Sedigh V, Balighi K *et al.* Immunologic prediction of relapse in patients with pemphigus vulgaris (PV) in clinical remission. *J. Am. Acad. Dermatol.* 74(6), 1160–1165 (2016).
- ▶ 86. Abasq C, Mouquet H, Gilbert D *et al.* ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. *Arch. Dermatol.* 145(5), 529–535 (2009).
- ▶ 87. Naseer SY, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Detailed profiling of anti-desmoglein autoantibodies identifies anti-Dsg1 reactivity as a key driver of disease activity and clinical expression in pemphigus vulgaris. *Autoimmunity* 48(4), 231–241 (2015).
- ▶ 88. Daneshpazhoo M, Kamyab K, Kalantari M-S *et al.* Comparison of desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay and direct immunofluorescence for evaluation of immunological remission in pemphigus vulgaris. *Clin. Exp. Dermatol.* 39(1), 41–47 (2014).
- ▶ 89. Behzad M, Mötts C, Kneisel A *et al.* Combined treatment with immunoadsorption and rituximab leads to fast and prolonged clinical remission in difficult-to-treat pemphigus vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 166(4), 844–852 (2012).
- ▶ 90. Müller R, Hunzelmann N, Baur V *et al.* Targeted immunotherapy with rituximab leads to a transient alteration of the IgG autoantibody profile in pemphigus vulgaris. *Dermatol. Res. Pract.* 2010, 321950 (2010).
- ▶ 91. Shetty S, Ahmed AR. Preliminary analysis of mortality associated with rituximab use in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 46(8), 487–496 (2013).
- ▶ 92. Østensen M, Lockshin M, Doria A *et al.* Update on safety during pregnancy of biological agents and some immunosuppressive anti-rheumatic drugs. *Rheumatol.* 47(Suppl. 3), iii28–31 (2008).
- ▶ 93. Harman KE, Brown D, Exton LS *et al.* British Association of Dermatologists' guidelines for the management of pemphigus vulgaris 2017. *Br. J. Dermatol.* 177(5), 1170–1201 (2017).
- ▶ 94. Fortner B, Viale PH. Health economic analysis of the burden of infusion reactions on patients, caregivers, and providers. *Oncology* 23(1 Suppl. 2), 31–36 (2009).
- ▶ 95. 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.* 19(3), 274–282 (2015).
- ▶ 96. 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.* 44(6), 615–620 (2017).
- ▶ 97. Feldman RJ. Paradoxical worsening of pemphigus vulgaris following rituximab therapy. *Br. J. Dermatol.* 173(3), 858–859 (2015).
- ▶ 98. Nili A, Tavakolpour S, Mahmoudi H, Noormohammadpour P, Balighi K, Daneshpazhoo M. Paradoxical reaction to rituximab in patients with pemphigus: a report of 10 cases. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 42(1), 56–58 (2020).
- ▶ 99. Proft F, Schulze-Koops H, Grunke M *et al.* [Safety and efficacy of off-label use of biologic therapies in patients with inflammatory rheumatic diseases refractory to standard of care therapy: data from a nationwide German registry (GRAID2)]. *Z Rheumatol.* 77(1), 28–39 (2018).
- ▶ 100. de Sena Nogueira Maehara L, Huizinga J, Jonkman MF. Rituximab therapy in pemphigus foliaceus: report of 12 cases and review of recent literature. *Br. J. Dermatol.* 172(5), 1420–1423 (2015).
- ▶ 101. Wei K-C, Chen W, Tang P-L, Huang Y-T. Pneumocystis jirovecii pneumonia infection in pemphigus patients treated with rituximab: an observational nationwide epidemiological study in Taiwan. *Eur. J. Dermatol.* 28(5), 713–715 (2018).
- ▶ 102. Amber KT, Lamberts A, Solimani F *et al.* Determining the incidence of pneumocystis pneumonia in patients with autoimmune blistering diseases not receiving routine prophylaxis. *JAMA Dermatol.* 153(11), 1137–1141 (2017).
- ▶ 103. Al-Harbi TM, Al-Muammar SA, Ellis RJ. Brain abscess following rituximab infusion in a patient with pemphigus vulgaris. *Am. J. Case Rep.* 16, 65–68 (2015).
- ▶ 104. Kütçüoğlu R, Kılıç S, Sun GP. Infective endocarditis in two patients with pemphigus vulgaris under multiagent immunosuppressive drug therapy: a rare entity to remember in the differential diagnosis of fever of unknown origin. *Dermatol. Ther.* 32(3), e12860 (2019).
- ▶ 105. Lee EB, Ayoubi N, Albayram M, Kariyawasam V, Motaparthi K. Cerebral toxoplasmosis after rituximab for pemphigus vulgaris. *JAAD Case Rep.* 6(1), 37–41 (2020).
- ▶ 106. Chiu H-Y, Chang C-Y, Hsiao C-H, Wang L-F. Concurrent cytomegalovirus and herpes simplex virus infection in pemphigus vulgaris treated with rituximab and prednisolone. *Acta Derm. Venereol.* 93(2), 200–201 (2013).
- ▶ 107. Quartier P, Tournilhac O, Archimbaud C *et al.* Enteroviral meningoencephalitis after anti-CD20 (rituximab) treatment. *Clin. Infect. Dis.* 36(3), e47–49 (2003).

108. Sagnelli E, Pisaturo M, Sagnelli C, Coppola N. Rituximab-based treatment, HCV replication, and hepatic flares. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 945950 (2012).
109. Li Y-R, Chen W-C, Tsai W-L *et al.* Severe acute exacerbation of HCV infection in cancer patients who undergo chemotherapy without antiviral prophylaxis. *J. Viral Hepat.*, doi: 10.1111/jvh.13302 (2020) (Epub ahead of print).
- ▶ 110. Pattullo V. Hepatitis B reactivation in the setting of chemotherapy and immunosuppression – prevention is better than cure. *World J. Hepatol.* 7(7), 954–967 (2015).
- ▶ 111. Kanwar AJ, Vinay K, Heelan K, Walsh S, Shear NH, Dhiman RK. Use of rituximab in pemphigus patients with chronic viral hepatitis: report of three cases. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 80(5), 422–426 (2014).
- ▶ 112. Tavakolpour S, Soori T, Noormohammadpour P, Balighi K, Mahmoudi H, Daneshpazhooh M. Rituximab administration in a patient with pemphigus vulgaris following reactivation of occult hepatitis B virus infection. *Dermatol. Online J.* 23(6), 13030/qt8927s9kt (2017).
- ▶ 113. Polansky M, Patel N, Feldman R. Complete remission after rituximab therapy in an HIV-positive patient with pemphigus vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 173(6), 1557–1559 (2015).
- ▶ 114. Focosi D, Tuccori M, Maggi F. Progressive multifocal leukoencephalopathy and anti-CD20 monoclonal antibodies: what do we know after 20 years of rituximab. *Rev. Med. Virol.* 29(6), e2077 (2019).
- ▶ 115. Levy R, Mahévas M, Galicier L *et al.* Profound symptomatic hypogammaglobulinemia: a rare late complication after rituximab treatment for immune thrombocytopenia. Report of 3 cases and systematic review of the literature. *Autoimmun. Rev.* 13(10), 1055–1063 (2014).
116. Boch K, Zillikens D, Langan EA, Schmidt E, Ludwig RJ. Low prevalence of late-onset neutropenia following rituximab treatment in patients with pemphigus [internet]. *J. Am. Acad. Dermatol.* S0190-9622(20)30945-2 (2020). doi:10.1016/j.jaad.2020.05.076.
- ▶ 117. Uzun S, Bilgiç Temel A, Akman Karakaş A *et al.* Efficacy and safety of rituximab therapy in patients with pemphigus vulgaris: first report from Turkey. *Int. J. Dermatol.* 55(12), 1362–1368 (2016).
- ▶ 118. Ramagopalan SV, Wotton CJ, Handel AE, Yeates D, Goldacre MJ. Risk of venous thromboembolism in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record-linkage study. *BMC Med.* 9, 1 (2011).
- ▶ 119. Li WW, Chen XX, Yu J, Wang Y, Bu DF, Tu P. Haemolytic anaemia following rituximab treatment in a patient with pemphigus vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 161(1), 205–206 (2009).
- ▶ 120. Didona D, Paolino G, Garcovich S, Caposiena Caro RD, Didona B. Successful use of etanercept in a case of toxic epidermal necrolysis induced by rituximab. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 30(10), e83–84 (2016).
- ▶ 121. Galimberti F, Fernandez AP. Sarcoidosis following successful treatment of pemphigus vulgaris with rituximab: a rituximab-induced reaction further supporting B-cell contribution to sarcoidosis pathogenesis? *Clin. Exp. Dermatol.* 41(4), 413–416 (2016).
- ▶ 122. Bayer G, Agjer M-S, Lioger B *et al.* Rituximab-induced serum sickness is more frequent in autoimmune diseases as compared to hematological malignancies: a French nationwide study. *Eur. J. Intern. Med.* 67, 59–64 (2019).
- ▶ 123. Shakshouk H, Daneshpazhooh M, Murrell DF, Lehman JS. Treatment considerations for patients with pemphigus during the COVID-19 pandemic. *J. Am. Acad. Dermatol.* 82(6), e235–236 (2020).
- ▶ 124. Klufas DM, Amerson E, Twu O, Clark L, Shinkai K. Refractory pemphigus vulgaris successfully treated with ofatumumab. *JAAD Case Rep.* 6(8), 734–736 (2020).
- ▶ 125. Ellebrecht CT, Choi EJ, Allman DM *et al.* Subcutaneous veltuzumab, a humanized anti-CD20 antibody, in the treatment of refractory pemphigus vulgaris. *JAMA Dermatol.* 150(12), 1331–1335 (2014).
- ▶ 126. Reddy V, Klein C, Isenberg DA *et al.* Obinutuzumab induces superior B-cell cytotoxicity to rituximab in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patient samples. *Rheumatology* 56(7), 1227–1237 (2017).
127. Novartis Pharmaceuticals. A randomized, partial-blind, placebo-controlled trial evaluating the efficacy, safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of VAY736 in the treatment of patients with pemphigus vulgaris. *Clinicaltrials.gov; 2019. Report No.: NCT01930175.* (2020). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01930175>
128. Principia Biopharma Inc. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial to evaluate the efficacy and safety of oral BTK inhibitor PRN1008 in moderate to severe pemphigus. *Clinicaltrials.gov; 2020. Report No.: NCT03762265.* (2020). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03762265>
129. Cabaletta Bio. A Phase I, open-label, safety and dosing study of autologous desmoglein 3 chimeric autoantibody receptor T cells (DSG3-CAART) in subjects with active, anti-DSG3, mucosal-dominant pemphigus vulgaris. *Clinicaltrials.gov; 2020. Report No.: NCT04422912.* (2020). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04422912>
130. Alexion Pharmaceuticals. A Phase IB/II, multicenter, open-label, safety, and dose-finding study of SYNT001 in subjects with pemphigus (vulgaris or foliaceus). *Clinicaltrials.gov; 2020. Report No.: NCT03075904.* (2020). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03075904>
131. Goebeler M, Bata-Csörgő Z, Baum S *et al.*, C *et al.* Efgartigimod in pemphigus: interim Phase II results. *Virtual Annual Meeting of the Society of Investigative Dermatology.* 13–16 May, 2020 Oral communication #537.
132. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Polyclonal regulatory T cells (PolyTregs) for pemphigus. *ClinicalTrials.gov; 2020. Report No.: NCT04422912.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04422912>

Annexe III



Paraneoplastic Pemphigus Revealed by Anti-programmed Death-1 Pembrolizumab Therapy for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Complicating Hidradenitis Suppurativa

OPEN ACCESS

Edited by:

Karin Loser,
University of Münster, Germany

Reviewed by:

Thilo Gambichler,
University Hospitals of the
Ruhr-University of Bochum, Germany
Giovanni Di Zazzo,
Institute of Dermatology Immacolata
(IRCCS), Italy

*Correspondence:

Frédéric Caux
frederic.caux@aphp.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work as co-first authors

Specialty section:

This article was submitted to
Dermatology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 10 July 2019

Accepted: 16 October 2019

Published: 05 November 2019

Citation:

Yatim A, Bohelay G,
Grootenboer-Mignot S,
Prost-Squarioni C, Alexandre M,
Le Roux-Villet C, Martin A, Maubec E
and Caux F (2019) Paraneoplastic
Pemphigus Revealed by
Anti-programmed Death-1
Pembrolizumab Therapy for
Cutaneous Squamous Cell Carcinoma
Complicating Hidradenitis
Suppurativa. *Front. Med.* 6:249.
doi: 10.3389/fmed.2019.00249

Ahmad Yatim^{1†}, Gérôme Bohelay^{1†}, Sabine Grootenboer-Mignot²,
Catherine Prost-Squarioni^{1,3}, Marina Alexandre¹, Christelle Le Roux-Villet¹,
Antoine Martin³, Eve Maubec¹ and Frédéric Caux^{1*}

¹ Department of Dermatology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases MALIBUL, Avicenne Hospital, AP-HP, University Paris 13, Bobigny, France, ² Laboratory of Immunology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases MALIBUL, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France, ³ Department of Pathology, Avicenne Hospital, AP-HP, University Paris 13, Bobigny, France

A 64-year-old patient developed a widespread autoimmune mucocutaneous blistering disease 3 weeks after the initiation of the anti-programmed death-1 (anti-PD-1) pembrolizumab therapy administered for a locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) of the buttocks arising from hidradenitis suppurativa. A diagnosis of paraneoplastic pemphigus (PNP) was made based on the presence of a suprabasal acantholysis associated with intercellular deposits of immunoglobulin G and C3 on basement membrane zone. Analysis of the patient's sera was positive on monkey bladder and detected circulating antibodies against desmoglein 3 and desmoplakin I prior to the initiation of pembrolizumab. At that time, the patient had few localized blisters limited to the peri-tumoral skin of the buttocks with acantholysis but without *in vivo* immune deposits. Pembrolizumab therapy was discontinued and a complete remission of PNP was obtained using oral steroids. Reintroduction of pembrolizumab resulted in flare of PNP. Given the close temporal relation between pembrolizumab initiation and the subsequent clinical expression of a widespread PNP, the patient was diagnosed with pre-existing subclinical PNP exacerbated by PD-1 inhibitor. The extreme rarity of PNP in the setting of cutaneous SCC and the effects of challenge, dechallenge, and rechallenge of pembrolizumab argue in favor of a checkpoint inhibitor related adverse effect. Our case is the first PNP associated with anti-PD-1 therapy and serological follow-up suggest that one infusion of pembrolizumab is sufficient to allow clinical expression of underlying pemphigus auto-immunity.

Keywords: paraneoplastic pemphigus, immune checkpoints inhibitors, anti-programmed-death-1, pembrolizumab, cutaneous squamous cell carcinoma, hidradenitis suppurativa

BACKGROUND

The immune system has developed sophisticated negative regulatory mechanisms to contain the development of autoimmunity. These regulatory mechanisms can be diverted by cancer cells to limit antitumor immunity. By counteracting these inhibitory signals, cancer immunotherapy aims to enhance immune responses to fight against tumors. Among several immunotherapeutic strategies tested these recent years, immune checkpoint inhibitors have come to the forefront in cancer treatment, showing remarkable benefit in the treatment of a wide range of cancer. By blocking negative regulators of lymphocyte activation, such as cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed cell death protein 1 (PD-1) or its ligand, programmed cell death ligand 1 (PD-L1), immune checkpoint inhibitors restore the function of effector T cells to target and destroy cancer cells. The drawback of inducing an effective immunity targeting cancers is the potential for autoimmune side effects, which are commonly termed immune-related adverse events (irAEs) (1). These manifest usually as organ-specific autoimmunity such as thyroiditis, colitis, hepatitis, or hypophysitis, among many others (2). A major challenge in the cancer immunotherapy field is therefore to increase the antitumor activity without promoting additional immune-related side effects.

Cutaneous side effects are among the most frequent checkpoint inhibitor irAEs. Skin related toxicity of any grade may be seen in up to 25% of patients treated with antibodies targeting CTLA-4 (3) and around 20% of patients undergoing anti-PD-1 treatments (4). These cover a wide range of clinical presentation such as pruritus sine materia, maculopapular eruption, vesicular or pustular lesions, alopecia, and acneiform and neutrophilic dermatosis (5). Although skin toxicity of immune checkpoint inhibitors is usually mild in severity, there are several reports of life-threatening dermatologic reactions to checkpoints blockade including drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (6), Stevens-Johnson syndrome (7), and toxic epidermal necrolysis (8). Moreover, several cases of autoimmune blistering diseases have been observed in patients receiving checkpoint inhibitors. So far, 34 cases of bullous pemphigoid (BP) associated with anti-PD1/PD-L1 therapy have been reported, as well as 2 cases of mucous membrane pemphigoid (MMP) (9) and 2 cases of atypical pemphigus with no mucosal involvement (10, 11). Here, we report the first case of a widespread mucocutaneous paraneoplastic pemphigus (PNP) associated with pembrolizumab therapy given for a

locally advanced cutaneous Squamous Cell Carcinoma (SCC) complicating Hidradenitis Suppurativa (HS).

CASE PRESENTATION

A 64-year-old man of Algerian origin presented with a 20-year history of sinuses and abscesses of the buttocks that had been



Abbreviations: Anti-PD-1, anti-programmed death-1; BP, bullous pemphigoid; BP180, 180 kDa bullous pemphigoid antigen; BP230, 230 kDa bullous pemphigoid antigen; kDa, kilodalton; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; DIF, direct immunofluorescence; DRESS, drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ENT, ear, nose and throat; HS, Hidradenitis Suppurativa; HSV-1, Herpes simplex virus 1; IgG, immunoglobulin G; IIF, indirect immunofluorescence; irAEs, immune-related adverse events; PD1, programmed cell death 1; PD-L1, programmed cell death ligand 1; PNP, paraneoplastic pemphigus; MMP, mucous membrane pemphigoid; SCC, squamous cell carcinoma.

FIGURE 1 | (A) Initial clinical presentation of the patient's buttocks showing severe hidradenitis suppurativa lesions complicated with multifocal squamous cell carcinoma. (B) Inflammatory swelling of the patient's buttocks and surrounding squamous cell carcinoma localization, 1 week after pembrolizumab administration. (C-H) Widespread mucocutaneous blistering disease 3 weeks after pembrolizumab with tense blisters (indicated by arrows) (C), erythema and edema of the face, pseudomembranous conjunctivitis and eyelid erosions (D), pustular lesions (E), large erythematous plaques (F), erosive stomatitis (G), and erosions of the glans penis (H).

TABLE 1 | Clinical and laboratory investigations.

	7-days before Pembrolizumab [†]	20-days after Pembrolizumab	21-days after oral steroids [‡]
Clinical presentation	Small intact bullae on the buttocks, herpetic stomatitis (HSV-1 positive)	Widespread polymorphic cutaneous lesions, severe stomatitis (HSV-1 negative), erosive conjunctivitis, and glans penis erosions	Complete remission
Histopathology	Suprabasal acantholysis	Suprabasal acantholysis	ND
DIF	Negative	Intercellular deposits of IgG and basement membrane zone of C3	ND
IIF on monkey esophagus			
Intercellular	Positive (1/1,000)	Positive (1/400)	Positive (1/40)
Basal membrane zone	Negative	Negative	Negative
IIF on monkey bladder	Positive	Positive	Positive
ELISA			
Anti-Desmoglein 1	Negative	Negative	Negative
Anti-Desmoglein 3	Negative	Negative	Negative
Anti-BP180	Negative	Negative	Negative
Anti-BP230	Negative	Negative	Negative
Anti-Envoplakin	Negative	Negative	Negative
Immunoblot			
Human amniotic membrane extract	Desmoplakin I (250 kDa) desmoglein 3 (130 kDa)	Desmoplakin I (250 kDa)	Negative
Recombinant periplakin	Negative	Negative	Negative

DIF, direct immunofluorescence; IIF, indirect immunofluorescence; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ND, not done; HSV-1, Herpes simplex virus 1. [†]with the exception of histopathology and DIF, performed 14-days before Pembrolizumab therapy; [‡]42-days after Pembrolizumab.

treated with several minor surgical procedures over the past 10 years. A family history was noted because the patient's son had similar early-stage lesions. Clinical examination revealed a diffuse involvement of the buttocks, perineal, and perianal regions, with multiple interconnecting tracts and abscesses across entire areas (Figure 1A). He was diagnosed with severe Hurley stage III HS. Multiple ulcerated lesions on his buttocks and large inguinal and external iliac lymphadenopathies were noted. The computed tomodensitometry revealed deep tumor infiltration associated with large inguinal and external iliac lymphadenopathies, multiple abscesses of the gluteal fold, internal obturator muscles and gluteus maximus, and a sacrococcygeal osteomyelitis. Histological examination of surgical biopsies performed on skin lesions revealed moderate or well-differentiated SCC. Given the extensive local spread, the tumor was deemed inoperable.

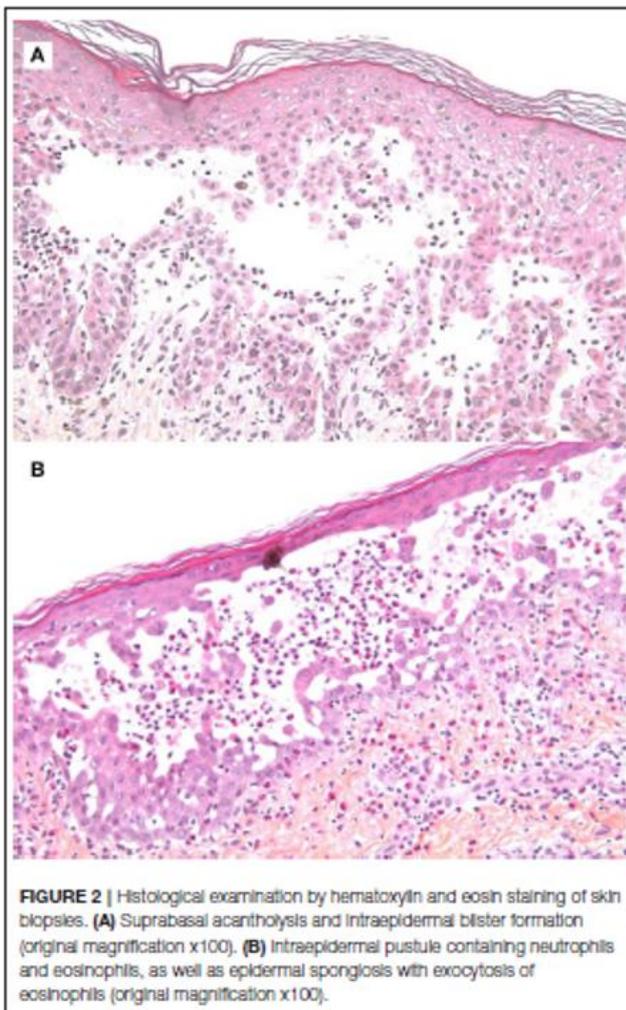
Physical examination also revealed few small intact bullae on the buttocks and painful erosions of the buccal mucosa. There were no vesicular or bullous lesions on the upper trunk, arms, legs or extremities, and no history of a prior bullous eruption. Mouth swabs were positive for herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA. Histopathological examination of a buttock blister revealed intraepidermal blistering and suprabasal acantholysis. Direct immunofluorescence (DIF) was negative for deposits of immunoglobulin (Ig) G, IgA, IgM, and C3. A diagnosis of pemphigus could therefore not be confirmed. The patient was treated with oral valaciclovir, which resulted in the almost complete healing of the oral and cutaneous lesions.

Due to the poor performance status (stage 4 in ECOG scale) and high-risk of sepsis-related complications, cytotoxic

chemotherapy was contraindicated for SCC treatment, and a treatment by anti-programmed cell death protein 1 (anti PD-1) was decided. One week after the first pembrolizumab administration (2 mg per kg), an intense inflammatory swelling affecting the HS areas was noted, followed by a relapse of the bullous cutaneous eruption (Figures 1B,C). Three weeks after the infusion, the patient developed erythema and edema of the face, bilateral pseudomembranous conjunctivitis with mucus discharge, and eyelid erosions (Figure 1D). Concomitantly, widespread polymorphic cutaneous lesions including flaccid and tense blisters, erosions, erythematous plaques, and pustular lesions occurred (Figures 1E,F). Mucosal examination revealed a severe stomatitis, crusting and bleeding erosions on the lips that extended beyond the vermilion border (Figure 1G), as well as erosions of the glans penis (Figure 1H). Ear, nose and throat endoscopic examination demonstrated erosions affecting the nasal mucosa, the arytenoids (75% of the surface), and the aryepiglottic folds (75%). The clinical differential diagnosis included PNP, pemphigus vulgaris (PV) and toxic epidermal necrolysis.

LABORATORY INVESTIGATIONS

Several series of skin punch biopsies were performed for histopathologic examination and DIF studies (Table 1). Histological examination by hematoxylin and eosin staining showed a suprabasal acantholysis and intraepidermal blister formations, without keratinocyte necrosis (Figure 2A),



supporting the hypothesis of a pemphigus and ruling out drug-induced toxic epidermal necrolysis. A second biopsy demonstrated a spongiotic dermatitis with exocytosis of eosinophils, intraepidermal pustule formation (Figure 2B), and superficial perivascular dermal infiltrate of eosinophils and lymphocytes. Scattered necrotic keratinocytes were observed in the second biopsy. DIF of the peribullous skin revealed intercellular deposits of IgG between keratinocytes, associated with linear deposits of C3 along the basement membrane, without IgA deposits. This combined pattern (intercellular and basement membrane staining) was suggestive of PNP. Indirect immunofluorescence (IIF) testing of the patient serum on monkey bladder epithelium revealed a staining of urothelial cell surface supporting the diagnosis of PNP. Characterization of circulating autoantibodies was performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. ELISA did not detect IgG autoantibodies to desmoglein 1, desmoglein 3, BP180 (NC16A), BP230, or envoplakin. Immunoblotting using human amniotic membrane extracts revealed a 250 kDa band corresponding to desmoplakin I but did not detect

autoantibodies to periplakin (Table 1). According to the clinical presentation, the immunofluorescence pattern and the immuno-serological profile, a diagnosis of probable PNP was made.

Given the presence of a localized acantholytic disease prior to immunotherapy and the short delay (<3 weeks) between pembrolizumab initiation and the widespread mucocutaneous eruption, we suspected that PD-1 blockage was associated with the aggravation of a preexisting condition, rather than the development of a *de novo* autoimmune disease. Therefore, we performed immunoblot analysis on the patient's serum collected 7 days before initiation of pembrolizumab therapy. Immunoblotting indicated the presence of circulating antibodies against the desmosomal components desmoplakin I and desmoglein 3. Consistently, IIF performed on monkey bladder epithelium using the same serum revealed a positive staining. Together, these results supported the presence of a subclinical PNP before the initiation of pembrolizumab (Table 1).

The pembrolizumab therapy was withheld and oral prednisone at 1 mg per kg daily was started. After 3 weeks of steroid treatment, complete clinical remission of the PNP was obtained and anti-desmoplakin I antibodies were no more detectable by immunoblotting (Table 1). Given the rapid progression of the SCC and the lack of alternative options, pembrolizumab therapy was restarted 6 weeks after the initial infusion while the patient remained under high dose of oral steroids (1 mg per kg daily). Pembrolizumab (2 mg per kg) resuming was associated with a PNP relapse affecting the oral cavity and nasopharyngeal mucous membrane. Immunotherapy was definitely discontinued after the third pembrolizumab dose due to grade II/III (CTCAE classification v4.0) relapsing symptoms resulting from PNP. The patient died of sepsis 3 months after initiation of corticosteroids.

DISCUSSION

A wide range of inflammatory skin disorders has been observed in patients treated with checkpoints inhibitors, including autoimmune blistering diseases. Current anti-PD1/PD-L1 therapy-associated autoimmune blistering diseases reported in the literature (including our patient) are presented in Table 2. To date, 34 cases of BP have been described in association with PD1 inhibitors, including 29 cases reviewed by Zumelzu (9) and five additional cases (13–16). In addition, a pharmacovigilance analysis performed on the Adverse Event Reporting System database of Food and Drug Administration recently demonstrated an increased risk to develop BP in patients treated by pembrolizumab or nivolumab (17); this signal was based on 35 case reports. Two cases of mild MMP limited to the oral cavity have also been described in patients under anti-PD1 therapy (9, 12). Apart from immune-mediated subepithelial blistering diseases, atypical suprabasal acantholytic dermatosis represents another emerging group of checkpoint inhibitor related skin toxicities. These are mainly Grover-like reactions (8 cases) and lichenoid dermatitis with suprabasal acantholysis (4 cases), without immune deposits or circulating

TABLE 2 | Autoimmune blistering diseases associated with anti-PD1/PD-L1 therapy.

Patients	Anti-PD1/PD-L1	Cancer type	Age (years)	Sex	Ipilimumab before anti-PD1	Cutaneous involvement	Mucosal involvement	Immunological findings	Delay to onset* (days)	Rechallenge
BULLOUS PEMPFIGOID: 34 CASES										
AI ^b	Nivolumab: 17 (50%) Pembrolizumab: 14 (41%) Durvalumab: 2 (6%) Atezolizumab: 1 (3%)	Melanoma: 21 (62%) NSCLC: 3 (9%) Lung adenocarcinoma: 3 (9%) Lung SCC: 1 (<3%) Tongue SCC: 1 (<3%) Renal cell carcinoma: 1 (<3%) Hepatocellular carcinoma: 1 (<3%) Gastric carcinoma: 1 (<3%) Urothelial cancer: 1 (<3%) Adenocarcinoma: 1 (<3%)	Median: 70.5 (55-90)	M: 22 (68%) F: 10 (32%) Ratio F/M: 0.45	Yes: 10 (31%) No: 22 (69%) [NR: 2]	Extensive: 17 (56%) Moderate: 8 (27%) Localized: 5 (17%) [NR: 4]	Yes: 6 (19%) No: 26 (81%) [NR: 2]	DIF: positive in 28 cases (90%), negative in 3 (10%), [NR: 3]. ELISA: anti-BP180 detected in 11 out of 12 cases (92%), anti-BP230 in 1 out of 10 (10%), [NR: 20].	Median: 178 (42-588)	RO: 29 (81%) R+: 2 (6%) R-: 1 (3%)
MUCOUS MEMBRANE PEMPFIGOID: 2 CASES										
Patient 1 (12)	Pembrolizumab	Merkel cell carcinoma	62	M	No	No	Oral	Anti-BP180 C-terminal detected by IB	91	RO
Patient 2 (5)	Pembrolizumab	Melanoma	83	F	No	No	Oral	Lamina densa immune deposits by IEM	462	RO
PEMPFIGUS: 3 CASES										
Patient 1 [atypical pemphigus, (10)]	Nivolumab	Urothelial cancer	68	M	No	Moderate: Bullae, pustules and erosions	No	DIF: Interacellular IgG/C3 deposits. ELISA: anti-Dsg3+, anti-Dsg2+, anti-Dsg3+. IB: negative.	188	RO
Patient 2 [atypical pemphigus, (11)]	Pembrolizumab	Tongue SCC	75	M	No	Extensive: BP-like presentation with urticarial plaques and tense blisters	No	DIF: Interacellular IgG/C3 deposits and linear IgG/IgA deposits (BMZ). ELISA: anti-BP230+. IB: NR.	82	RO
Patient 3 (PNP, our case)	Pembrolizumab	Cutaneous SCC	64	M	No	Extensive: flaccid and tense blisters, erosions and pustules	Conjunctival, oral, nasal, pharyngeal, genital, anal	DIF: Interacellular IgG deposits and linear C3 deposits (BMZ). ELISA: negative. IB: anti-desmoplakin I+, anti-Dsg3+	20	R+

*Time between the first anti-PD1/PD-L1 dose and onset of the autoimmune blistering disease.

^bAll 34 cases of Bullous Pemphigoid, including 29 reviewed by Zureicki (6) and five cases reported after 2017 (13-16).
NSCLC, Non small cell lung cancer; SCC, squamous cell carcinoma; IB, immunoblot; M, male; F, female; NR, not reported; DIF, direct immunofluorescence; BMZ, basal membrane zone; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IEM, immunoelectron microscopy; Dsg3, Desmoglein-3; Dsg2, Desmoglein-2; Dsg3, Desmoglein-3; BP, bullous pemphigoid; RO, no rechallenge (no reintroduction of the treatment); R+, positive rechallenge (disease relapse after reintroduction of the treatment); R-, negative rechallenge (no disease relapse after reintroduction of the treatment).

antibodies targeting desmosomal components [reviewed in (11)]. Suprabasal acantholysis associated with immune deposits at the surface of keratinocytes has been reported in only two patients under anti-PD1 therapy. The first case reported by Ito et al. was a 68-year-old man with urothelial carcinoma treated with nivolumab who developed a polymorphic cutaneous eruption with bullae, pustules, and erosions. He had circulating autoantibodies targeting desmocollin-2 and -3, which are usually found in atypical types of pemphigus but not classical pemphigus (10). The second case was a 75-year-old man with SCC of the tongue who developed, under pembrolizumab therapy, a bullous eruption with a histopathology image and DIF pattern suggestive of PNP (11). Both cases did not show any mucosal involvement nor any other typical manifestations of PV or PNP. In contrast, our patient developed after pembrolizumab therapy a diffuse mucocutaneous eruption highly suggestive of PNP. The histopathology and serum analysis confirmed the diagnosis of PNP although immunological results were atypical by the absence of anti-envoplakine and periplakin antibodies, which are however only found in 60 and 90% of PNP cases (18). Our patient had anti-desmoplakin I antibodies which are associated with PNP in up to 47% of patients (19).

PNP may have developed independently of pembrolizumab therapy. However, several data are suggestive of a checkpoint inhibitor related adverse effect in our patient: (1) PNP has never been reported previously in the setting of a cutaneous SCC, making the combination of PNP and cutaneous SCC an extremely rare phenomenon; (2) the close temporal relation between pembrolizumab initiation and the subsequent development of PNP clinical lesions (challenge); (3) the favorable outcome after pembrolizumab interruption and corticosteroids treatment (dechallenge); (4) the relapse after pembrolizumab reintroduction (rechallenge). Using the Begaud scoring system (20), we assessed the intrinsic accountability score of anti-PD1 therapy in PNP expression for our patient. With a chronological scoring (combining status of challenge, dechallenge, and rechallenge) of C3 (likely) and a symptomatological scoring of S2 (plausible), the intrinsic accountability scoring is high (15) in our case. The two previously reported cases of pemphigus associated with anti-PD1 blockade also have high intrinsic accountability scores (13 and 15), while <37% of induced BP reported cases were given high accountability scores (9). Although autoimmune diseases, such as inflammatory bowel diseases and spondyloarthritis, seems to occur more frequently in patients with HS, there is no association (to our knowledge) between HS and pemphigus. Interestingly, a recent article reports the development of a localized acantholytic disease associated with anti-desmoglein 1 and 3 circulating antibodies in a patient with HS of the buttocks (21). This case highlights the possibility that autoimmunity against desmosomal components might be triggered by a chronic skin inflammatory process like HS. Thus, we cannot rule out that PNP in our patient was induced by HS-related inflammation rather by the cutaneous SCC.

Several pathophysiologic models for PNP have been proposed. First, neoplasms arising from immune cell expansion have

been shown to dysregulate B-cell homeostasis resulting in the subsequent production of autoantibodies targeting desmosome components. This is best illustrated by the identification of B-cell tumor clones producing antibodies targeting desmosomal plakin proteins in resected Castleman tumors (22), thymoma, and follicular dendritic cell sarcoma (23). However, this tumor antibody production hypothesis may not apply to other solid cancers associated with PNP. Alternatively, autoimmunity against keratinocytes may be the consequence of cross-reactivity between tumor antigens and normal epithelial proteins. Autoantigens routinely identified in PNP are expressed by epithelial malignancies. In our case, the patient had a skin SCC, a cancer arising from keratinocytes. Thus, antitumor immune responses to his carcinoma could cross-react with normal epidermal antigens. Therefore, distinct pathophysiologic mechanisms might explain PNP arising in the context of neoplasms involving B-cells vs. PNP associated to solid tissue epithelial tumors. Importantly, the fact that PNP is rarely associated with epithelial malignancies, which comprise the majority of human cancers, indicates that autoimmunity arising from tumor antigen cross-reactivity remains a marginal, very contained situation. This could be explained by at least two mechanisms. First, cancer cells adopt a variety of mechanisms to avoid immune recognition. Second, the immune system has evolved negative feedback mechanisms, known as checkpoints, to prevent autoimmunity. In both mechanisms, inhibitory receptors such as PD-1 and CTLA-4 have been found to play important functions (24). In our case, PD-1 blockage was rapidly associated with the expression of a severe PNP, supporting a central role of PD-1 signaling in the suppression of immune responses against antigens shared between normal and transformed keratinocytes. Because checkpoint inhibitors are now used in a growing number of human cancers, one could expect an increase in the future of cross-reactivity mediated paraneoplastic syndromes such as PNP associated to epithelial malignancies or paraneoplastic neurological syndromes triggered by the ectopic expression of neuronal antigens by tumors (25).

In summary, we reported a patient with extensive skin SCC who developed PNP after one infusion of pembrolizumab. The presence of autoantibodies directed against desmoplakin I and desmoglein 3 was demonstrated before the anti-PD-1 therapy. PNP in this patient was clearly induced since rechallenge was positive. So PNP should be added to the list of immune-related adverse events associated with checkpoint blockade such as BP.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any

potentially identifiable images or data included in this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AY, GB, and FC designed the study. SG-M conducted the immunological analyses. CP-S and AM performed the pathological studies. MA and CL collected clinical data. AY wrote the first draft of the manuscript. GB did modifications. FC

and EM corrected the final version. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank physicians who referred this patient to our department and the physicians of our multidisciplinary team who did ENT and stomatological examinations (Dr. Isaac Soued and Dr. Francis Pascal).

REFERENCES

- Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade. *N Engl J Med*. (2018) 378:158–68. doi: 10.1056/NEJMra1703481
- Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD, Topalian SL, Schadendorf D, Larkin J, et al. Safety profile of nivolumab monotherapy: a pooled analysis of patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*. (2017) 35:785–92. doi: 10.1200/JCO.2015.66.1389
- Minkis K, Garden BC, Wu S, Pulitzer MP, Lacouture ME. The risk of rash associated with ipilimumab in patients with cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. (2013) 69:e121–8. doi: 10.1016/j.jaad.2012.12.963
- Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. (2015) 16:375–84. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8
- Curry JL, Tetzlaff MT, Nagarajan P, Drucker C, Diab A, Hymes SR, et al. Diverse types of dermatologic toxicities from immune checkpoint blockade therapy. *J Cutan Pathol*. (2017) 44:158–76. doi: 10.1111/cup.12858
- Voskens CJ, Goldinger SM, Loquai C, Robert C, Kaehler KC, Berking C, et al. The price of tumor control: an analysis of rare side effects of anti-CTLA-4 therapy in metastatic melanoma from the ipilimumab network. *PLoS ONE*. (2013) 8:e53745. doi: 10.1371/journal.pone.0053745
- Saw S, Lee HY, Ng QS. Pembrolizumab-induced Stevens-Johnson syndrome in non-melanoma patients. *Eur J Cancer*. (2017) 81:237–9. doi: 10.1016/j.ejca.2017.03.026
- Vivar KL, Deschaine M, Messina J, Divine JM, Rabionet A, Patel N, et al. Epidermal programmed cell death-ligand 1 expression in TEN associated with nivolumab therapy. *J Cutan Pathol*. (2017) 44:381–4. doi: 10.1111/cup.12876
- Zumelzu C, Alexandre M, Le Roux C, Weber P, Guyot A, Levy A, et al. Mucous membrane pemphigoid, bullous pemphigoid, and anti-programmed death-1/programmed death-ligand 1: a case report of an elderly woman with mucous membrane pemphigoid developing after pembrolizumab therapy for metastatic melanoma and review of the literature. *Front Med*. (2018) 5:268. doi: 10.3389/fmed.2018.00268
- Ito M, Hoashi T, Endo Y, Kimura G, Kondo Y, Ishii N, et al. Atypical pemphigus developed in a patient with urothelial carcinoma treated with nivolumab. *J Dermatol*. (2019) 46:e90–2. doi: 10.1111/1346-8138.14601
- Chen WS, Tetzlaff MT, Diwan H, Jahan-Tigh R, Diab A, Nelson K, et al. Suprabasal acantholytic dermatologic toxicities associated checkpoint inhibitor therapy: a spectrum of immune reactions from paraneoplastic pemphigus-like to Grover-like lesions. *J Cutan Pathol*. (2018) 45:764–73. doi: 10.1111/cup.13312
- Haug V, Behle V, Benoit S, Kneitz H, Schilling B, Goebeler M, et al. Pembrolizumab-associated mucous membrane pemphigoid in a patient with Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol*. (2018) 179:993–4. doi: 10.1111/bjd.16780
- Pontecilla NM, Khanna T, Bayan CY, Antonov NA, Geislin LJ. Bullous pemphigoid associated with a new combination checkpoint inhibitor immunotherapy. *J Drugs Dermatol*. (2019) 18:103–4.
- Thomsen K, Diernaes J, Ollegaard TH, Spaun E, Vestergaard C. Bullous pemphigoid as an adverse reaction to pembrolizumab: two case reports. *Case Rep Dermatol*. (2018) 10:154–7. doi: 10.1159/000489661
- Lopez AT, Geskin L. A case of nivolumab-induced bullous pemphigoid: review of dermatologic toxicity associated with programmed cell death protein-1/programmed death ligand-1 inhibitors and recommendations for diagnosis and management. *Oncologist*. (2018) 23:1119–26. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0128
- Hirotsu K, Chiou AS, Chiang A, Kim J, Kwong BY, Pugliese S. Localized bullous pemphigoid in a melanoma patient with dual exposure to PD-1 checkpoint inhibition and radiation therapy. *JAAD Case Rep*. (2017) 3:404–6. doi: 10.1016/j.jder.2017.06.004
- Aggarwal P. Disproportionality analysis of bullous pemphigoid adverse events with PD-1 inhibitors in the FDA adverse event reporting system. *Expert Opin Drug Saf*. (2019) 18:623–33. doi: 10.1080/14740338.2019.1619693
- Poot AM, Diercks GF, Kramer D, Schepens I, Klunder G, Hashimoto T, et al. Laboratory diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol*. (2013) 169:1016–24. doi: 10.1111/bjd.12479
- 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) 89:1775–82. doi: 10.1172/JCI115781
- Miremont-Salame G, Theophile H, Haramburu F, Begaud B. Causality assessment in pharmacovigilance: the French method and its successive updates. *Therapie*. (2016) 71:179–86. doi: 10.1016/j.therap.2016.02.010
- Kurihara Y, Furue M. Gluteal hidradenitis suppurativa presenting pemphigus-like findings: case report. *BMC Dermatol*. (2019) 19:11. doi: 10.1186/s12895-019-0091-7
- Wang L, Bu D, Yang Y, Chen X, Zhu X. Castleman's tumours and production of autoantibody in paraneoplastic pemphigus. *Lancet*. (2004) 363:525–31. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15539-6
- Wang J, Bu DF, Li T, Zheng R, Zhang BX, Chen XX, et al. Autoantibody production from a thymoma and a follicular dendritic cell sarcoma associated with paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol*. (2005) 153:558–64. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06599.x
- Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol*. (2018) 8:86. doi: 10.3389/fonc.2018.00086
- Graus F, Dalmau J. Paraneoplastic neurological syndromes in the era of immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. (2019) 16:535–48. doi: 10.1038/s41571-019-0194-4

Conflict of Interest: FC is a consultant for Principia Biopharma. EM is consultant for MSD and has received support for congress from BMS and MSD.

The remaining 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 Yatim, Bohelay, Grootenboer-Mignot, Prost-Squarcioni, Alexandre, Le Roux-Villet, Martin, Maubec and Caux. 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.

Annexe IV



Rituximab Therapy for Mucous Membrane Pemphigoid: A Retrospective Monocentric Study With Long-Term Follow-Up in 109 Patients

OPEN ACCESS

Edited by:

Erno Schmidt,
University of Lübeck, Germany

Reviewed by:

Claudia Günther,
Technical University Dresden,
Germany
Yoshiro Horai,
Sasebo City General Hospital, Japan

*Correspondence:

Philippe Musette
philippe.musette@aphp.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

[‡]These authors have contributed
equally to this work and share
last authorship

Specialty section:

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

Received: 07 April 2022

Accepted: 23 May 2022

Published: 30 June 2022

Citation:

Bohelay G, Alexandre M,
Le Roux-Villet C, Sibon J, Doan S,
Soued I, Shoufick J, Rousset L,
Mellotée B, Heller M, Lièvre N,
Zumelzu C, Morin F,
Grootenboer-Mignot S, Gabison E,
Caux F, Prost-Squarconi C and
Musette P (2022) Rituximab Therapy
for Mucous Membrane Pemphigoid: A
Retrospective Monocentric Study With
Long-Term Follow-Up in 109 Patients.
Front. Immunol. 13:915205.
doi: 10.3389/fimmu.2022.915205

Gérôme Bohelay^{1,2†}, Marina Alexandre^{1†}, Christelle Le Roux-Villet¹,
Ishai Sibon¹, Serge Doan³, Isaac Soued⁴, Jason Shourick⁵, Laurie Rousset¹,
Benoît Mellotée¹, Michel Heller⁶, Nicole Lièvre⁶, Coralie Zumelzu¹, Florence Morin⁷,
Sabine Grootenboer-Mignot⁸, Eric Gabison³, Frédéric Caux^{1,2},
Catherine Prost-Squarconi^{1,6,9‡} and Philippe Musette^{1,2,4‡}

¹Department of Dermatology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Avicenne Hospital, Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis, AP-HP, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France, ²Inserm UMR 1125 L2P, UFR SMBH Léonard de Vinci, Université Sorbonne Paris Nord (USPN), Bobigny, France, ³Department of Ophthalmology, Bichat University Hospital, AP-HP, Université de Paris, Paris, France, ⁴Department of ENT and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Avicenne Hospital, Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis, AP-HP, Bobigny, France, ⁵Department of Epidemiology, Clinical Epidemiology and Public Health, UMR 1027 NSEPM-University of Toulouse II, Toulouse University Hospital (CHU), Toulouse, France, ⁶Department of Histology, UFR SMBH Léonard de Vinci, Université Sorbonne Paris Nord (USPN), Bobigny, France, ⁷Department of Immunology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Saint Louis University Hospital, AP-HP, Université de Paris, Paris, France, ⁸Department of Immunology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Bichat University Hospital, AP-HP, Université de Paris, Paris, France, ⁹Department of Pathology, Avicenne University Hospital, Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis (HUPSSD), AP-HP, Université Sorbonne Paris Nord (USPN), Bobigny, France

Mucous membrane pemphigoid (MMP) is a heterogeneous group of rare, chronic, subepithelial autoimmune blistering diseases (AIBDs) with predominant involvement of mucous membranes that can be sight-threatening and life-threatening. Rituximab (RTX) has demonstrated its efficacy in severe MMP refractory to conventional immunosuppressants in small series that differed in RTX scheme, concomitant therapies, and outcome definitions. In a meta-analysis involving 112 patients with MMP treated with RTX, complete remission (CR) was reported in 70.5% of cases. Herein, we report the largest retrospective monocentric study on RTX efficacy in a series of 109 severe and/or refractory patients with MMP treated with RTX with a median follow-up period of 51.4 months. RTX was administered in association with immunomodulatory drugs (dapsone, salazopyrine) without any other systemic immunosuppressant in 104 patients. The RTX schedule comprised two injections (1 g, 2 weeks apart), repeated every 6 months until CR or failure, with a unique consolidation injection (1 g) after CR. The median survival times to disease control and to CR were 7.1 months and 12.2 months, respectively. The median number of RTX cycles required to achieve CR in 85.3% of patients was two. The larynx was the lesional site that took the longest time to achieve disease control. One year after RTX weaning, CR off RTX was obtained in 68.7% of cases.

CR off RTX with only minimum doses of immunomodulatory drugs was achieved in 22.0% of patients. Further, 10.1% of patients were partial responders and 4.6% were non-responders to RTX. Relapse occurred in 38.7% of cases, of whom 91.7% had achieved CR again at the last follow-up. In MMP, CR was achieved in a longer time and after more rituximab cycles than in pemphigus, especially for patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity. RTX with concomitant immunomodulatory drugs was not responsible for an unusual proportion of adverse events. This large study confirms that RTX is an effective therapy in patients with severe and/or refractory MMP, corroborating previous findings regarding the effects of RTX on AIBDs such as pemphigus.

Keywords: rituximab, mucous membrane pemphigoid, fibrotic conjunctivitis, epidermolysis bullosa acquisita, linear bullous IgA dermatosis, autoimmune bullous diseases

INTRODUCTION

Mucous membrane pemphigoid (MMP) comprises a heterogeneous group of rare, chronic, autoimmune subepithelial blistering diseases responsible for blistering and erosions with predominant involvement of mucous membranes and a tendency of scarring (1–3). MMP diagnosis relies on clinical examination, histological examination, and the identification of immune deposits along the basement membrane zone on direct immunofluorescence (DIF) or direct immunoelectron microscopy (DIEM) (2). Serum immunological analyses may identify auto-antibodies directed against several basement membrane antigens such as BP180, BP230, laminin-332, $\alpha 6\beta 4$ -integrin, and collagen VII (2). MMP primarily affects the oral and conjunctival mucosa but may involve all malpighian mucous membranes. Patients with mild disease, involving only the oral mucosa and/or skin, might achieve complete remission (CR) with topical corticosteroids or with immunomodulatory drugs, such as dapsone, sulfasalazine, and tetracycline (2, 4–6). However, in severe cases with the involvement of multiple sites or isolated ocular, or laryngo-tracheal/esophageal mucous membrane involvement, a more aggressive first-line approach is usually employed to prevent the consequences of mucous membrane inflammation and scarring that might lead to irreversible sequelae or death. In such patients, conventional immunosuppressants (ISAs) such as cyclophosphamide or mofetil mycophenolate, alone or in association with corticosteroids, have been shown to have good efficacy and are usually rapidly started (2, 7–9). Nevertheless, the latter might be insufficient or contra-indicated. In studies with small series, biologic therapies such as off-label rituximab (RTX) have been shown to be useful in achieving CR in MMP cases. In 2011, we published a series of 25 patients with severe and/or refractory MMP treated with RTX, of whom 88% achieved CR after one or two cycles of RTX (10). As per recent European guidelines, RTX is indicated in

association with dapsone for the treatment of MMP refractory to ISAs (2). Recently, a systematic review investigated the literature regarding MMP treated with biologics and concluded that 70.5% of 112 patients treated with heterogeneous RTX regimens achieved CR, with a 35.7% recurrence rate during a mean follow-up period of 1.9 years (11). Since MMP is a rare disease, controlled studies are difficult to conduct and retrospective studies of well-characterized patients in real clinical settings with long term follow-up are of significant interest. Herein, we provided the outcomes of 109 patients with MMP treated at our center with the same off-label RTX protocol during a 10-year period to investigate the efficacy of RTX in MMP according to outcome definitions outlined in the 2015 expert consensus statement on MMP (12). Statistical analyses were performed to identify the factors associated with CR, and relapse.

METHODS

This single center, retrospective study was conducted on patients followed-up between 2009 and 2021 at Avicenne Hospital (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France), using the computer database (eDBAI) of the referral center for AIBDs. We obtained local institutional review board approval to conduct this study (#CLEA-2022-236).

Patient Selection

All patients with a diagnosis of MMP who received RTX at our center between 2009 and 2019 were identified by a computer search in the eDBAI database and were screened for inclusion. This inclusion period avoided the screening of patients reported in our previous study (10). To accurately evaluate RTX efficacy, we excluded MMP cases having received RTX for a surgical procedure while being in CR, those with less than 6 months of follow-up after baseline, or those with concomitant initiation of RTX and another biologic therapy (e.g., intravenous immunoglobulins, omalizumab) during the same period.

Standard Assessment of AIBD in our Referral Center

All patient information was systematically recorded and stored in a computerized medical chart standardized for AIBDs after

Abbreviations: AIBD, auto-immune blistering disease; BP180, bullous pemphigoid 180 kDa antigen; BP180-NCl6A, non-collagenous 16 A region of BP180; BP230, bullous pemphigoid 230 kDa antigen; CR, complete remission; DC, disease control; DIF, direct immunofluorescence; DIEM, direct immunoelectron microscopy; IVIG, intravenous immunoglobulins; ISA, immunosuppressants; MMP, mucous membrane pemphigoid; MMPDAI, mucous membrane pemphigoid disease activity index; RTX, rituximab.

obtaining written informed consent from the patients. The definite diagnosis of subepithelial AIBD and its type relied on a multidisciplinary clinical assessment recording past medical history; cutaneous and mucous membrane lesions; as well as histological and immunological tests, as recommended (2, 3) and previously reported (13). The methods used included direct immunofluorescence (DIF), indirect immunofluorescence (IIF) on rat and/or monkey esophagus and primate salt-split skin, direct immunoelectron microscopy (DIEM), serum anti-BP180-NC16A and anti-BP230 IgG using commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), serum anti-collagen VII IgG using commercial and/or in-house ELISA (14), and IgG immunoblotting performed with human amniotic membrane extract (15). A multidisciplinary clinical assessment was systematically performed including, at first visit and during follow-up, dermatologists, stomatologists, ophthalmologists, and otorhinolaryngologists from the referral center. The scoring of the fibrotic component of ocular involvement used the stages described by Foster et al. (3, 16). In cases of MMP with isolated chronic fibrotic conjunctivitis, serum immunological analyses and DIF of another uninvolved site were frequently negative, and conjunctival biopsy for DIEM analysis may be postponed or not carried out considering the risk of worsening the sight-threatening ocular scarring in case of diffuse activity. In such cases, chronic conjunctivitis with limbitis may be regarded as a distinctive sign of ocular MMP (3). Thus, in evocative cases of ocular MMP without DIF or DIEM positivity, MMP diagnosis relied on clinical exclusion of alternative diagnoses (2). MMP with anti-type VII collagen reactivity were defined according to DIEM (electron-dense immune deposits on the anchoring fibrils, **Figure 1**) results and/or presence of circulating anti-type VII collagen antibodies in accordance with the 2018 consensus on epidermolysis bullosa acquisita (EBA) (17).

RTX Administration Schedule in Patients With MMP

A collegial decision of the department of dermatology to begin RTX administration as an off-label therapy was taken

considering our previous experience in the field with patients with MMP in therapeutic impasse and/or bearing comorbidities that did not allow the use of other conventional ISAs (2, 9, 10). In patients with a history of cancer in remission, the agreement of the referring oncologist was required to start RTX therapy. The RTX schedule comprised a first cycle at baseline (two infusions of 1 g, 2 weeks apart). Conventional ISAs (e.g., cyclophosphamide, mofetil mycophenolate) were stopped before RTX therapy which was used in combination with immunomodulatory therapies (e.g., dapsone, sulfasalazine, tetracyclines). If patients already received topical or systemic corticosteroids, a stable dose was maintained until disease control (DC). Some patients with MMP with severe disease and without clinical improvement at the 3-months follow-up from baseline received a second cycle of RTX (two infusions of 1 g, 2 weeks apart) at this point. From the sixth month from baseline, additional cycles (two infusions of 1 g, 2 weeks apart) were repeated every 6 months until CR. After reaching CR, patients with MMP had a consolidation cycle of RTX (one infusion of 1 g, 6 months apart from the last cycle) before RTX cessation. In relapsing patients after RTX cessation, RTX was resumed according to the same schedule. For patients exhibiting partial remission or chronic relapse, RTX infusions were continued every 6 months with one or two infusions of 1 g, 2 weeks apart, on an individual basis. In case of RTX failure (see below), RTX administration was stopped, and an alternative therapy was commenced. The management of therapeutic de-escalation after reaching CR comprised the maintenance of immunomodulatory drugs at the same dosage until CR off RTX, before their progressive tapering to achieve CR off RTX with minimal therapy.

Outcome Definitions

Outcomes were defined according to the 2015 consensus statement for MMP (12). The baseline was defined as the day that patients with MMP were administered the first RTX injection. DC was defined as the absence of new lesions with only established lesions in healing. DC was reported for each site individually and for all sites involved. CR was defined as the

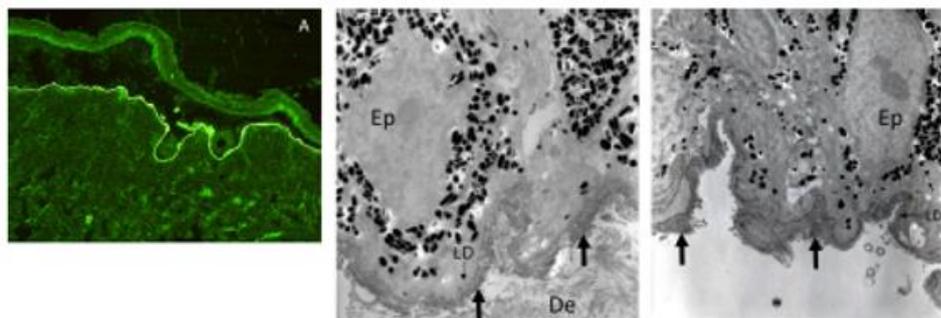


FIGURE 1 | Immune deposits in indirect immunofluorescence microscopy on salt-split skin and in direct immunoelectron microscopy in a patient with MMP with anti-type VII collagen reactivity. Indirect immunofluorescence microscopy on primate salt-split skin showing a labeling of the floor of the cleavage by the serum of a patient with MMP with anti-type VII collagen reactivity (**A**). Direct immunoelectron microscopy in a patient with MMP with anti-type VII collagen reactivity showing thick IgG (**B**) and C3 (**C**) deposits (large arrows) in the anchoring fibril zone below the lamina densa (LD, thin arrows) and split (asterisk) below them (Ep, epidermis; De, dermis).

absence of new non-transient or healing of established lesions for 2 months in all sites involved; CR on RTX and CR off RTX were defined according to the time from the last RTX infusion in CR patients; those still in CR 1 year after the last RTX infusion were classified as CR off RTX. CR off RTX with minimal therapy was defined as CR off RTX with minimal doses of concomitant immunomodulatory drugs as defined in the 2015 consensus statement (e.g., dapsone ≤ 1.0 mg/kg/d, salazopyrin 1 g/d, doxycycline 100 mg/d, colchicine 0.5 mg/d). Partial response was defined as the halving of the activity part of the MMP disease area severity index (MMPDAI) score in comparison with baseline. Patients who did not reach partial response were considered as non-responders. Patients with absence of improvement after the first two RTX cycles or with insufficient response subsequently (non-responders or partial responders) with persistence of mucous membrane involvement at high risk of complications such as ocular, laryngo-tracheal, and esophageal involvement were considered as RTX failure. Time to DC and time to CR were defined from baseline to the date of the first visit presenting with DC or CR, respectively. Relapse was defined as non-transient lesion occurrence. The endpoint of the follow-up was defined as the last visit or the date on which RTX was replaced by another therapy for patients with RTX failure.

Collected Data

The data collected included baseline information, sex, results of diagnostic investigations, age at diagnosis, time duration between first symptoms and diagnosis, clinical involvement at diagnosis, and treatment lines before RTX.

At baseline, gender, age, time duration between first symptoms/diagnosis and baseline, indication for RTX therapy, concomitant treatments received from baseline in association with RTX, data on clinical involvement, and MMPDAI (activity score) were collected. For topical corticosteroids, only the skin application of high-potency topical corticosteroids (betamethasone dipropionate or propionate clobetasol ≥ 10 g/d) was recorded.

During follow-up, the response to RTX (no response, partial response, CR, CR off RTX, CR off RTX with minimal therapy), time to achieve DC for each site involved and for the whole sites, time to achieve CR, number of RTX cycles and injections to achieve DC and CR, date and treatment of relapses, adverse events, number of RTX cycles and injections at last follow-up, concomitant treatments at last follow-up, and follow-up duration were collected. Lymphopenia was defined as a lymphocyte blood count < 1.0 G/L. Neutropenia was defined as a neutrophil blood count < 0.5 G/L. Severe adverse events were defined as grade 3 adverse events according to the common terminology criteria for adverse events (CTCAE v5.0) (18).

Statistical Analysis

Descriptive and comparative analyses were computed with StatView software (v5.0, SAS Institute Inc). Quantitative variables were expressed as medians and interquartile range or extreme values, as indicated, according to normality assessed by the Shapiro-Wilk test. Time to DC, time to CR, and time to relapse were determined with Kaplan-Meier survival curves and

were expressed as median survival times and standard deviations. Qualitative variables were presented as numbers and proportions. Adverse events were expressed as number, proportions, and incidence per 100 person-year, which was calculated based on the follow-up duration from baseline, except for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related adverse events that only included the patients followed-up during the COVID-19 pandemic.

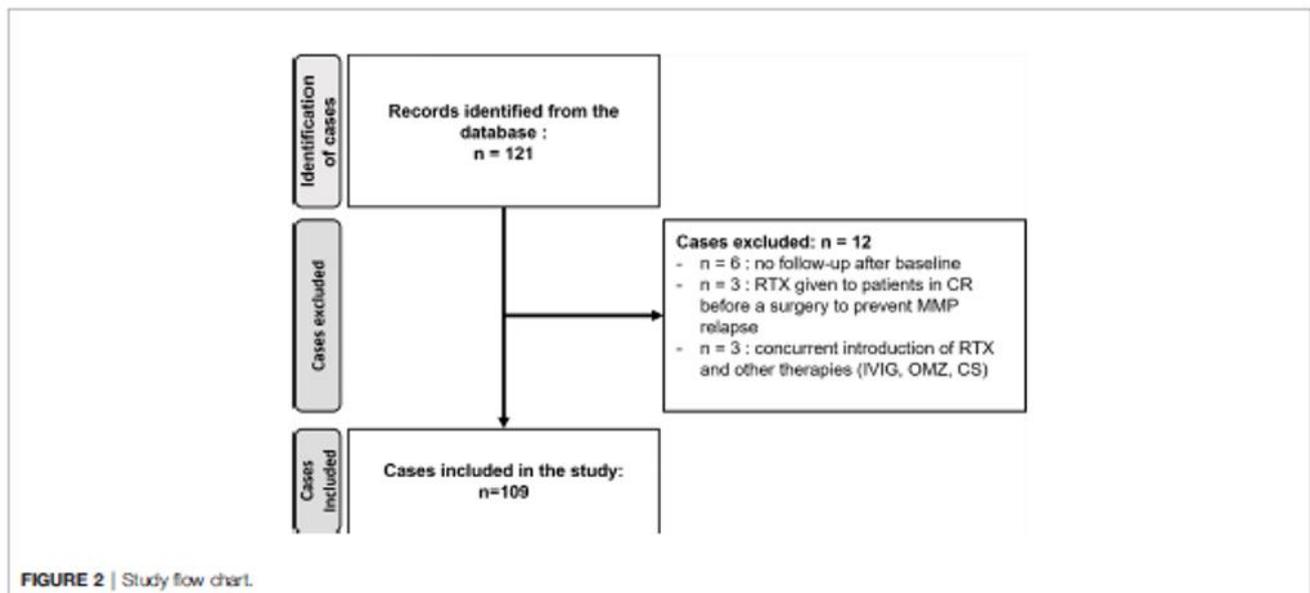
To identify factors influencing the CR, patients in CR and those without CR were compared at the 8-month follow-up and included only patients with 8 months of follow-up after baseline. CR was studied at the 8-month follow-up because, considering the definition of CR given above, it corresponded to complete healing without new lesions from the 6-month follow-up and afforded sufficient numbers of patients in groups for statistical analyses. Analyses aimed at identifying factors influencing the relapse included only patients having reached CR and having ≥ 12 months of follow-up after the CR date. For quantitative variables, univariate comparisons between the different subgroups of patients with MMP were performed using Mann-Whitney tests, but for time to CR, log-rank tests were used. For qualitative variables, univariate comparisons were performed using Pearson's χ^2 tests, with or without Yate's continuity correction, or Fisher's exact tests, as appropriate, according to the size of the sample. The factors associated with response to RTX were identified by univariate and backward stepwise multivariate logistic-regression analyses, with their respective significance levels set at < 0.20 and < 0.05 .

Besides, to assess factors influencing the CR, time to CR determined with Kaplan-Meier survival curves were studied for clinical and immunological parameters. For these univariate comparisons, log-rank tests were used. Prism[®] software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used to perform the figures of Kaplan-Meier survival curves.

RESULTS

Study Population Before RTX Therapy

We identified 121 patients with MMP who received RTX during the study period. Twelve were not included in the study based on the exclusion criteria (Figure 2). The study cohort included 109 patients (Table 1). There was a slight majority of females (51.4%). The median age at MMP diagnosis was 69.7 years and the median time between first symptoms and diagnosis was 15.9 months (range: 0–475 months). The diagnosis had been confirmed by the identification of linear immunoglobulins or complement deposits on the basement membrane zone on DIF and/or DIEM in 93 patients (85.3%). Specifically, 81 patients (74.3%) had immune deposits on DIF, and 76 patients (69.7%) had immune deposits in DIEM of whom 12 were negative on DIF (11.0%). IIF was positive in 36 patients (33.0%) and circulating antibodies were found in 52 patients (47.7%) in ELISA or immunoblotting. The antibodies against specific basement membrane antigens found in ELISAs or immunoblotting were antibodies to BP180 (29.4%, $n = 32$),



collagen VII (9.2%, $n = 10$), BP230 (6.4%, $n = 7$), laminin 332 (5.5%, $n = 6$), LAD-1 (3.7%, $n = 4$), and $\alpha 6$ subunit of $\alpha 6\beta 4$ integrin (1.8%, $n = 2$). Three patients had a negative result for anti-BP180-NC16A ELISA but had a 180-kDa band by immunoblotting. Ten patients (9.2%) had circulating antibodies to several antigens of the basement membrane zone. Nine patients were diagnosed as MMP based on clinical examination, after alternative diagnoses had been ruled out, in the absence of immune deposits in DIF ($n = 6$) or in DIEM ($n = 3$) and without circulating antibodies in ELISA. In these nine cases, the MMP involved a unique mucous membrane: conjunctival in eight and tracheal in one.

Strictly mucosal involvement was observed in 51.4% of the 109 patients, and mucocutaneous involvement was observed in 48.6%. Severe MMP accounted for 95.4% of cases with ≥ 3 mucosal sites involved in 67.0% of patients and/or a mucosal involvement at high risk of complication; ocular conjunctivae, larynx, or esophagus were involved in 59.6%, 49.5%, and 8.3% of cases, respectively. A previous period of CR before baseline was only reported in 9.2% of cases; 80.7% of patients had undergone non-immunosuppressive treatments, such as dapsone and/or salazopyrine (67.9%), and 66.1% had been administered one or more conventional ISAs, notably cyclophosphamide (50.5%).

Study Population at Baseline

RTX therapy was commenced in patients with MMP with a median age of 70.5 years (range: 16–93 years), after a median time of 35.8 months between the first symptoms and baseline (range: 1.3–486.0 months) and a median time of 7.4 months between the diagnosis and baseline (range: 0.3–280.7 months) (Table 2). RTX therapy was commenced in patients with active MMP having a median MMPDAI score of 10.9 (range: 0–52) with a median number of two sites involved (range: 1–6 sites); ≥ 3 sites were involved at baseline in 40.4% of cases. The most common mucosal sites involved were the mouth (61.5%),

conjunctivae (51.4%), and larynx/trachea (39.4%); laryngeal involvement is not included in MMPDAI explaining that some patients had a value of zero for the MMPDAI score. All 56 patients with conjunctival involvement had severe involvement with Foster's stage \geq IIC, of whom 49 patients (87.5%) had Foster's stage \geq III, for at least one eye. Patients with MMP had an active disease refractory to immunomodulatory drugs (*i.e.*, dapsone, salazopyrine, colchicine, acitretin, and doxycycline) and conventional ISAs in 82.6% and 66.1% of cases, respectively. The other factors that led to RTX use were treatment side-effects, contraindication to conventional ISAs, and non-compliance to treatments (28.4%, 22.9%, and 5.5%, respectively). At baseline, the concomitant therapies used with RTX comprised immunomodulatory drugs (78.0%), systemic corticosteroids (4.6%), and skin application of topical corticosteroids (15.6%). No patient had other conventional immunosuppressants at baseline.

Clinical Response After RTX Adjunction to Concomitant Treatments and Outcome

During the median follow-up time of 51.4 months (range: 1.2–132.8 months), patients with MMP received a median value of four cycles of RTX corresponding to six RTX infusions (Table 3). Most patients received ≥ 2 RTX cycles (89.0%). Within 1 year after baseline, patients with MMP received a median value of two RTX cycles (range: 1–4 cycles). The median time between the first two cycles of RTX was 6.1 months, but 24 patients (22.0%) underwent a second cycle before the fourth month from baseline.

After baseline, 97 patients (89.0%) achieved DC with a median survival time of 7.1 months after one RTX cycle (median) (Table 3). The site with the longest time taken to achieve DC was the larynx/trachea, with a median survival time of 8.2 months. Ninety-three patients (85.3%) achieved CR with a median survival time of 12.2 months after two RTX cycles (median). The number of RTX cycles to achieve CR ranged

TABLE 1 | Mucous membrane pemphigoid characteristics at diagnosis.

Characteristics	All MMP N = 109
Female gender, N (%)	56 (51.4)
Age at diagnosis (years), median (IQR)	69.7 (21.6)
Delay between symptoms and diagnosis (months), median (IQR)	15.9 (30.4)
Immune deposits on BMZ	
Immune deposits in DF ^a	
IgG, N (%)	64 (66.0)
IgA, N (%)	29 (29.9)
IgM, N (%)	2 (2.1)
C3, N (%)	60 (61.9)
Immune deposits in DEM or DF ^b	
IgG, N (%)	78 (77.2)
IgA, N (%)	39 (38.6)
C3, N (%)	77 (76.2)
Anti-BP180 antibodies, N (%)	32 (29.4)
Involvement at diagnosis	
Mucocutaneous, N (%)	56 (51.4)
Mucous only, N (%)	
MMP with anti-type VII collagen reactivity, N (%)	12 (11.0)
Sites affected at diagnosis	65 (59.6)
Ocular, N (%)	
Nose and throat, N (%)	74 (67.9)
Larynx/Trachea, N (%)	54 (49.5)
Esophageal, N (%)	9 (8.3)
Genital, N (%)	34 (31.2)
Anal, N (%)	20 (18.3)
Buccal, N (%)	71 (65.1)
Cutaneous, N (%)	53 (48.6)
Number of sites involved, median (IQR)	3 (2.0)
≥3 sites involved, N (%)	73 (67.0)
Severe MMP, N (%)	104 (95.4)
Prior failed treatments	
Immunomodulatory drugs ¹ , N (%)	88 (80.7)
DDS/salsalazine, N (%)	74 (67.9)
ISAs, N (%)	72 (66.1)
Cyclophosphamide, N (%)	55 (50.5)
Prednisone, N (%)	12 (11.0)
MMF, N (%)	7 (6.4)
Cyclosporine, N (%)	4 (3.7)
IVIg, N (%)	4 (3.7)
Azathioprine, N (%)	2 (1.8)
MTX, N (%)	2 (1.8)
RTX ² , N (%)	1 (0.9)
Previously had a period of CR before baseline, N (%)	10 (9.2)

MMP, mucous membrane pemphigoid; IQR, interquartile range; BMZ, basement membrane zone; DF, direct immunofluorescence; DEM, direct immun electron microscopy; DDS, dapsone; ISAs: immunosuppressive agents; MMF: mycophenolate; IVIG, intravenous immunoglobulins; MTX: methotrexate; RTX, rituximab. ^abased on 97 cases who had DF; ^bbased on 101 cases who had DF or DEM; ¹i.e., DDS, sulfasalazine, doxycycline or equivalent, hydroxychloroquine, acitretin or colchicine; ²this patient had had one RTX cycle 5 years before baseline in another center.

from one to seven cycles and only 29 patients (26.6%) were in CR after a single cycle (Table 3). Repeating the cycles according to the schedule resulted in an increase of the cumulative proportion of patients having achieved CR for the first time (Figure 3). This cumulative proportion reached 61.5% for those having undergone one to two cycles and 74.3% for those having undergone one to three cycles (Figure 3). From baseline, 49 patients (45%) achieved CR within a year. In the 93 patients that achieved CR, the median time duration in CR at the end of the follow-up was 28.9 months. During the follow-up, 64 of the 109 patients (58.7%) achieved CR off RTX, which lasted for a median

TABLE 2 | Patient characteristics at baseline.

Characteristics	All MMP N = 109
Age at baseline (years), median (IQR)	70.5 (20.0)
Time duration (months) between first symptoms and baseline, median (IQR)	35.8 (60.6)
Time duration (months) between diagnosis and baseline, median (IQR)	7.4 (13.2)
Baseline involvement	
MMPDAI activity score, median (IQR)	10.9 (13.2)
Number of sites involved, median (IQR)	2 (1–6)
≥1 site involved, N (%)	70 (64.2)
≥2 sites involved, N (%)	44 (40.4)
Ocular, N (%)	56 (51.4)
Larynx and/or trachea, N (%)	43 (39.4)
Buccal, N (%)	67 (61.5)
Skin, N (%)	30 (27.5)
Genital, N (%)	12 (11.0)
Anal, N (%)	12 (11.0)
Esophagus, N (%)	7 (6.4)
RTX indication	
Refractory/contraindication to immunomodulatory drug ¹ , N (%)	89 (81.7)
Refractory to ISAs, N (%)	71 (65.1)
Time duration of ISAs treatment, median (IQR)	5.0 (5.7)
Contraindication to conventional ISA, N (%)	25 (22.9)
Treatment side effects, N (%)	31 (28.4)
Non-compliance with treatments, N (%)	6 (5.5)
Concomitant therapies at baseline	
Immunomodulatory drugs ¹ , N (%)	85 (78.0)
DDS and/or salsalazine, N (%)	72 (66.1)
Topical corticosteroids ² , N (%)	17 (15.6)
Systemic corticosteroids, N (%)	5 (4.6)

MMP, mucous membrane pemphigoid; IQR, interquartile range; MMPDAI, mucous membrane pemphigoid disease activity index; ISA, immunosuppressive agents; DDS, dapsone. ¹i.e., DDS, sulfasalazine, doxycycline or equivalent, hydroxychloroquine, acitretin or colchicine; ²cutaneous application of more than 10g/d of high potent topical corticosteroids.

time of 24.9 months; 24 patients (22.0%) achieved CR off RTX with minimal therapy, which lasted for a median time of 21.1 months; 40 patients (36.7%) achieved CR off RTX but still received higher doses of immunomodulatory drugs than those receiving minimal therapy (see methods for doses), for a median time of 21.7 months. Twenty-nine of the 109 patients (26.6%) did not achieve CR off RTX at the last follow-up and were still in CR on RTX.

After CR, 36 of the 93 patients (38.7%) experienced at least one relapse and nine (9.7%) had at least two relapses (Table 3). The first relapse occurred 0.8 to 110.4 months after CR and involved a median number of one site (range: 1–3 sites) with a median MMPDAI score of 2.25, which was lower than the baseline score. The most frequently involved mucosal site during relapses was the conjunctiva (44.0%). After this first relapse, CR was achieved again in 33 patients (91.7%) in 3 to 37.8 months after one cycle of RTX (median); the remaining three patients had insufficient follow-up after relapse to evaluate their response to the treatment.

At the last follow-up, 97.2% of patients underwent immunomodulatory concomitant therapies, notably dapsone or sulfasalazine (90.8%) (Table 3). None of the patients in CR were administered concomitant conventional ISAs and only one patient was still receiving systemic corticosteroids (0.9%). At

TABLE 3 | Outcome of rituximab therapy in patients with mucous membrane pemphigoid.

Characteristics	All MMP N = 109
Follow-up duration (months), median (range)	51.4 (1.2–132.8)
Total number of RTX cycles, median (IQR)	4.0 (4.0)
Total number of RTX injections, median (IQR)	6.0 (6.0)
Number of RTX cycles within 1st year after baseline, med (IQR)	2 (1–4)
Number of RTX injections within 1st year after baseline, med (IQR)	4 (1–7)
Patients with at least 2 cycles, N (%)	97 (89.0)
Time duration between the first two RTX cycles (months), median (IQR)	6.1 (2.9)
Patients with less than 4 months between the first two RTX cycles, N (%)	24 (22.0)
Disease control, N (%)	97 (89.0)
Time to DC (months), median survival (SD)	7.1 (0.5)
Number of RTX cycles to achieve DC, median (range)	1 (1–6)
Time to disease control according to the site	
Ocular, median survival (SD)	6.3 (2.0)
Larynx, median survival (SD)	8.2 (0.7)
Skin, median survival (SD)	3.7 (1.1)
Buccal, median survival (SD)	5.7 (0.8)
Genital, median survival (SD)	5.7 (1.4)
Anal, median survival (SD)	3.5 (0.2)
CR, N (%)	93 (85.3)
Time to CR (months), median survival (SD)	12.2 (0.4)
Number of cycles to achieve CR, median (range)	2 (1–7)
Number of injections to achieve CR, median (range)	4 (2–14)
Patients in CR after one cycle, N (%)	29 (26.6)
Patients in CR after one or two cycles, N (%)	67 (61.5)
CR achieved within 1st year after baseline, N (%)	49 (45.0)
Time duration in CR (months), median (range)	28.9 (0.7–110.4)
CR off RTX, N (%)	64 (58.7)
Time duration in CR off RTX (months), median (range)	24.9 (0.5–101.3)
CR off RTX with minimal therapy, N (%)	24 (22.0)
Time duration in CR off RTX with minimal therapy (months), median (range)	21.1 (2.4–70.9)
CR off RTX with more than minimal therapy, N (%)	40 (36.7)
Time duration in CR off RTX with more than minimal therapy (months), median (range)	21.7 (0.5–101.3)
CR on RTX, N (%)	29 (26.6)
Time duration in CR on RTX (months), median (range)	11.7 (0.7–78.9)
Relapses after CR	
First relapse [§] , N (%)	36 (38.7)
MMPDAI at relapse [†] , median (range)	2.2 (0.0–15.0)
Number of sites involved [‡] , median (range)	1 (1–3)
Ocular [‡] , N (%)	16 (44.4)
Laryngeal [‡] , N (%)	7 (19.4)
Buccal [‡] , N (%)	11 (30.6)
Skin [‡] , N (%)	9 (25.0)
Genital [‡] , N (%)	1 (2.8)
CR after relapse treatment [†] , N (%)	33 (91.7)
Number of RTX cycles to achieve CR [†] , median (range)	1 (0–4)
Time to CR [†] , median (range)	5.6 (3.0–37.8)
Second relapse [§] , N (%)	9 (9.7)
≥2 relapses [§] , N (%)	1 (1.1)
Partial response, N (%)	11 (10.1)
No response, N (%)	5 (4.6)

(Continued)

TABLE 3 | Continued

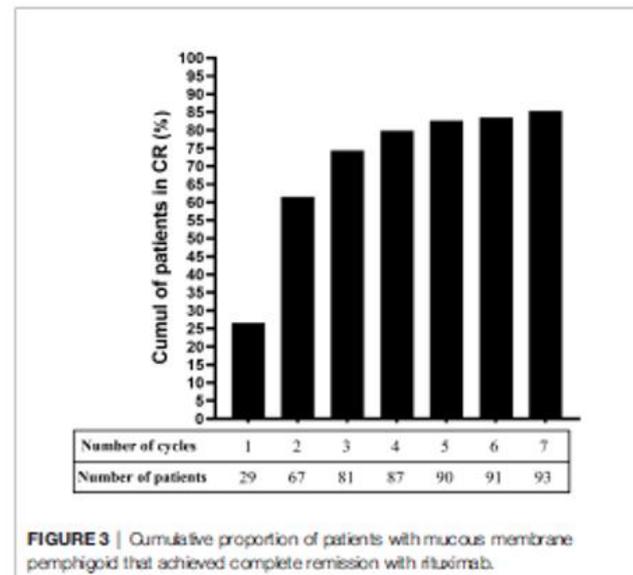
Characteristics	All MMP N = 109
Concomitant therapies at last follow-up, N (%)	106 (97.2)
DDS and/or sulfasalazine, N (%)	99 (90.8)
Topical corticosteroids [‡] , N (%)	1 (0.9)
Systemic corticosteroids, N (%)	1 (0.9)

MMP, mucous membrane pemphigoid; RTX, rituximab; IQR, interquartile range; DC, disease control; SD, standard deviation; CR, complete remission; MMPDAI, mucous membrane pemphigoid disease activity index; DDS, dapsone. [†]based on 93 cases who had CR; [‡]based on 36 cases who had a relapse; [§]cutaneous application of more than 10g/d of high potent topical corticosteroids. [¶]corresponds to the definition of ^{*}based on 93 cases in CR.

the last follow-up, 16 patients (14.7%) did not achieve CR, 11 (10.1%) only achieved partial response, and five (4.6%) had no response to RTX. In the 16 patients without CR, a median of one site was still involved (range: 1–3) at the last follow-up and mainly comprised conjunctival (50.0%) and laryngeal mucous membranes (31.1%). RTX failure was concluded in five patients (4.6%) after five RTX cycles in median, corresponding to four of the 11 patients in partial response PR and one of the five non-responders; the four remaining cases of non-responders were not yet considered RTX failure at the last follow-up because of their short follow-up period after baseline. The five patients with RTX failure then underwent alternative therapies (IVIg, cyclophosphamide, anti-TNF α); there was no disease improvement in four patients. One of them achieved complete remission after undergoing combination therapy with anti-TNF α and IVIg.

Adverse Events During Follow-Up After Baseline

During follow-up, 51 of the 109 patients (46.8%) had biological or clinical adverse events, of whom 23 patients (21.1%) had severe adverse events according to CTCAE grading (Table 4). Biological adverse events were reported in 29 patients (26.6%)

**FIGURE 3 |** Cumulative proportion of patients with mucous membrane pemphigoid that achieved complete remission with rituximab.

and comprised lymphopenia in 28 patients (25.7%) and severe neutropenia in one patient that led to RTX cessation after the first cycle. Nevertheless, 24 of the 28 patients (84.7%) with lymphopenia already had lymphopenia before RTX therapy after having received cyclophosphamide, and none of them had a lymphocyte blood count <0.5 G/L.

Clinical adverse events were reported in 31.2% of the 109 patients with MMP and occurred after a median number of two cycles of RTX (range: 1–7 cycles). Most of those comprised infectious events (18.3%) with a broad spectrum of reported infections. Notably, 12 of the 109 (11.0%) patients had infectious pneumonitis, four (3.7%) had bacterial urinary tract infections, and four (3.7%) had severe bacterial or candida septicemia. Three patients (2.7%) had COVID-19 infections before COVID-19 vaccination was available. Notably, nine of the 12 patients who developed pneumonia had laryngeal involvement at baseline. The incidence for infectious diseases was 4.1 per 100 person-year. The incidences for each infectious cause were below 1.0 per 100 person-year; however, for COVID-19 infection and bacterial pneumonitis, the incidences were 3.16 and 2.47 per 100 person-year, respectively. Non-infectious adverse events occurred in 11.0% of patients; 4.6% had mild infusion reaction. Six patients (5.5%) had cancer (two breast adenocarcinomas, one of which was a local relapse from a cancer previously in remission, one prostatic adenocarcinoma, one bronchopulmonary carcinoma, and two skin carcinomas) at a median age of 74.1 years (range: 54.6–84.3 years). Except for

patients with skin carcinomas, all patients with cancer adverse events had received cyclophosphamide before RTX. None of the patients who had cancer had antibodies to laminine-332.

Seven patients (6.4%) with a median age of 79.9 years died during the follow-up. Deaths occurred at a median time of 13.2 months after the last RTX infusion. Three deaths were not considered as related to RTX (one from a cerebral vascular stroke in an 83-year-old patient, one from a bronchopulmonary cancer that occurred 8 years after the last RTX infusion, and one from a ruptured aneurysm). Four deaths (3.7%) were possibly related to RTX (one from stage IV breast adenocarcinoma, one with severe bacterial pneumonia complicating an MMP-related tracheal stenosis, and two from unknown causes).

Factors Associated With Response After RTX Therapy in Patients With MMP

First, as follow-up time durations varied among cases, we aimed at identifying factors significantly associated with CR by comparing patients with or without CR at the 8-month follow-up (Table 5). Univariate analyses included 101 patients with MMP of whom 27 achieved CR and 74 did not achieve CR 8 months after baseline (Table 5). Patients in CR at the 8-month follow-up had received significantly less RTX cycles/injections during these first months, which was in line with treatment schedule described in the methods section. Some parameters recorded had *P*-values <0.2 (age at diagnosis, MMP with anti-

TABLE 4 | Adverse events during follow-up.

	All N = 109		Incidence per 100 person-year
Adverse events, N (%)	51	(46.8)	10.51
Severe adverse events, N (%)	23	(21.1)	4.74
Biological adverse events, N (%)	29	(26.6)	5.98
Neutropenia, N (%)	1	(0.9)	0.21
Lymphopenia, N (%)	28	(25.7)	5.77
Preexisting before RTX, N (%)	24	(22.0)	na
Clinical adverse events, N (%)	34	(31.2)	7.01
Number of cycles before adverse events, median (range)	2	(1-7)	0.41
Infectious adverse events, N (%)	20	(18.3)	4.12
Bacterial pneumopathy, N (%)	12	(11.0)	2.47
COVID-19 infection, N (%)	3	(2.7)	3.16
Flue, N (%)	1	(0.9)	0.21
Bacterial cellulitis, N (%)	1	(0.9)	0.21
Tuberculosis, N (%)	1	(0.9)	0.21
Bacterial otitis, N (%)	1	(0.9)	0.21
Bacterial urinary tract infection, N (%)	4	(3.7)	0.82
Severe bacterial septicemia, N (%)	3	(2.8)	0.62
Candida septicemia, N (%)	1	(0.9)	0.21
Non-infectious adverse events, N (%)	12	(11.0)	2.47
Infusion reaction, N (%)	5	(4.6)	1.03
Cardiac arrhythmia, N (%)	1	(0.9)	0.21
Heart failure, N (%)	1	(0.9)	0.21
NASH, N (%)	1	(0.9)	0.21
Cancer, N (%)	6	(5.5)	1.24
Death, N (%)	7	(6.4)	na
Age at death (years), median (range)	79.9	(41.5-91.2)	na
Time duration between last RTX and death, median (months), median (range)	13.2	(1.2-93.6)	na
Imputable to RTX, N (%)	4	(3.7)	na

RTX, rituximab; NASH, non-alcoholic steatosis hepatitis; na, not acquired.

Number (N) and percentage (%) of patients who had adverse events.

TABLE 5 | Univariate analysis: factors associated with complete remission at 8-month follow-up in 101 patients with MMP.

Variables	All ^a N = 101	No CR N = 74	CR N = 27	P-value ^{b,c}
Female gender, N (%)	52 (51.5)	36 (48.7)	16 (59.3)	0.3450
Age at diagnosis (years), median (IQR)	69.7 (21.5)	66.8 (26.4)	70.9 (18.6)	0.0684
Time duration (months) between symptoms and diagnosis, median (IQR)	15.9 (33.4)	15.4 (38.0)	15.9 (21.8)	0.7443
Immune deposits at BMZ in DIF				
IgG, N (%) ^d	73 (77.7)	53 (77.9)	20 (76.9)	>0.9999
IgA, N (%) ^d	37 (39.4)	28 (41.2)	9 (34.6)	0.7290
IgG and IgA, N (%) ^d	29 (30.9)	22 (32.4)	7 (26.9)	0.7947
Exclusive IgA, N (%) ^d	8 (8.5)	6 (8.8)	2 (7.7)	>0.9999
C3, N (%) ^d	72 (72.6)	53 (77.9)	19 (73.3)	0.8212
Anti-BP180 antibodies, N (%)	30 (29.7)	21 (28.4)	9 (33.3)	0.8113
MMP with anti-type VII collagen reactivity, N (%)	12 (11.9)	11 (14.9)	1 (3.7)	0.1735
Mucosal involvement only at diagnosis, N (%)	50 (49.5)	38 (51.4)	12 (44.4)	0.5389
Ocular monosite MMP, N (%)	17 (16.8)	11 (14.9)	6 (22.2)	0.5639
Severe disease at diagnosis, N (%)	97 (96.0)	71 (95.9)	26 (96.3)	>0.9999
Therapeutic lines before baseline				
Immunomodulatory drugs ^e , N (%)	81 (80.2)	58 (78.4)	23 (85.2)	0.6309
DDS/salazopyrine, N (%)	68 (67.3)	48 (64.9)	20 (74.1)	0.5248
ISAs, N (%)	67 (66.4)	53 (71.8)	14 (51.9)	0.1041
Cyclophosphamide, N (%)	52 (51.5)	39 (52.7)	13 (48.1)	0.6582
Previously had a period of CR before baseline, N (%)	9 (8.9)	8 (10.8)	1 (3.7)	>0.4381
Age at baseline (years), median (IQR)	70.5 (19.0)	70.2 (25.4)	71.0 (18.0)	0.1417
Time duration between first symptoms and baseline (months), median (IQR)	34.2 (63.5)	41.4 (83.3)	32.1 (35.8)	0.1258
Time duration between diagnosis and baseline (months), median (IQR)	7.3 (13.3)	7.1 (18.1)	7.5 (14.3)	0.3203
RTX indication				
Refractory/contraindication to immunomodulatory drugs ^e , N (%)	78 (77.2)	57 (77.0)	21 (77.8)	>0.9999
Refractory to ISAs, N (%)	66 (65.3)	52 (70.3)	14 (51.9)	0.0852
Time duration of ISAs treatment (months), median (IQR)	4.0 (6.0)	4.0 (5.0)	6.0 (9.0)	0.4846
Contraindication to conventional ISA, N (%)	23 (22.8)	16 (21.8)	7 (25.9)	0.8484
Baseline involvement				
Number of sites involved, median (IQR)	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)	0.3843
Ocular, N (%)	52 (51.5)	41 (55.4)	11 (40.7)	0.1919
Laryngeal, N (%)	42 (41.6)	33 (44.8)	9 (33.3)	0.4293
Buccal, N (%)	63 (62.4)	46 (62.2)	17 (63.0)	0.9414
Skin, N (%)	29 (28.7)	22 (29.7)	7 (25.9)	0.8982
Genital, N (%)	12 (11.9)	9 (12.2)	3 (11.1)	>0.9999
Anal, N (%)	12 (11.9)	10 (13.5)	2 (7.4)	0.5069
Esophagus, N (%)	7 (6.9)	6 (8.1)	1 (3.7)	0.6713
≥1 site involved, N (%)	68 (67.3)	51 (68.9)	17 (63.0)	0.5722
≥2 sites involved, N (%)	43 (42.6)	33 (44.8)	10 (37.0)	0.4966
Baseline activity MMPDAI score, median (IQR)	11.0 (13.7)	11.7 (11.2)	7.0 (16.7)	0.1478
Concomitant treatments at baseline				
Immunomodulatory drugs ^e , N (%)	78 (77.2)	56 (75.7)	22 (81.5)	0.7261
DDS and/or salazopyrine, N (%)	68 (67.3)	48 (64.9)	20 (74.1)	0.5248
Systemic corticosteroid, N (%)	4 (4.0)	4 (5.4)	0 (0.0)	>0.5713
Topical corticosteroids ^f , N (%)	16 (15.9)	10 (13.5)	6 (22.2)	0.4497
Number of RTX cycles in 8 months, median (IQR)	2 (1.0)	2 (0.0)	2.0 (1.0)	0.0118
Number of RTX injections in 8 months, median (IQR)	4 (2.0)	4 (1.0)	3 (1.7)	0.0001
≥ 3 RTX injections, N (%)	61 (60.4)	54 (73.0)	7 (25.9)	<0.0001
Concomitant immunomodulatory drugs after baseline, N (%)	99 (98.0)	73 (98.7)	26 (96.3)	0.4651
Initiation/resumption of DDS/salazopyrine after baseline, N (%)	27 (26.7)	23 (31.1)	4 (14.8)	0.1304

CR, complete remission; IQR, interquartile range; BMZ, basement membrane zone; DIF, direct immunofluorescence; DDS, dapsons; ISAs, immunosuppressive agents; RTX, rituximab; MMPDAI, mucous membrane pemphigoid disease activity index. ^aOnly the 101 patients with MMP and more than 8 months of follow-up after baseline were included in this analysis. ^bUnivariate comparison analysis between the CR and non-CR groups. ^cbased on 94 cases; ^di.e., DDS, Sulfasalazine, dapsone or equivalent, hydroxychloroquine, acetylretin or colchicine; ^ecutaneous application of more than 10g/d of high potent topical corticosteroids.

type VII collagen reactivity, having received or being refractory to conventional ISAs, time duration between diagnosis and baseline, ocular involvement at baseline, activity MMPDAI score at baseline, initiation or resumption of disulone or salazopyrine after baseline) but none of them demonstrated *P*-values <0.05 in univariate analysis (Table 5). The backward stepwise logistic-regression multivariate analyses retained the

time between the first symptoms and baseline (OR, 0.986; [95% CI 0.973–0.998]; *P* = 0.0265), the activity MMPDAI score at baseline (OR 0.944; [95% CI 0.890–1.00]; *P* = 0.0495) and being refractory to conventional ISAs (OR 0.299; [95% CI 0.105–0.849]; *P* = 0.0495) as factors associated with the absence of CR at the 8-month follow-up. For this logistic-regression model, R-squared was 0.117.

Second, we aimed at identifying parameters significantly associated with a longer survival time to CR. The same parameters as for the analyses at the 8-month follow-up were studied. Patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity achieved CR in a longer time ($P = 0.0186$, median survival time: 16.6 months) in comparison with patients with MMP without anti-type VII collagen reactivity (median survival time: 12.1 months) (Figure 4A). Patients with an esophageal involvement also achieved CR in a longer time ($P = 0.0053$, median survival time: 35.1 months) in comparison with patients without esophageal involvement (median survival time: 12.1 months) (Figure 4B). The difference observed according esophageal involvement might be dependent on the “MMP with anti-type VII collagen reactivity” parameter. Indeed, patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity had significantly ($P = 0.026$) more frequently esophageal involvement at baseline (33.3%) in comparison with other patients (3.1%) and demonstrated the longer time to achieve CR among patients with esophageal involvement. For the other parameters studied, the groups had no significant difference in the time to achieve CR. Notably, the survival analysis comparing the groups with or without IgA deposits in DIF or DIEM, circulating anti-BP180 antibodies, or ocular involvement at baseline showed no significant difference (Figures 4C–E). Noteworthy, as patients with MM-EBA, patients with ocular involvement had received more RTX injections during the first year ($P = 0.0092$) of follow-up and during the entire follow-up ($P = 0.0583$) than those without ocular involvement.

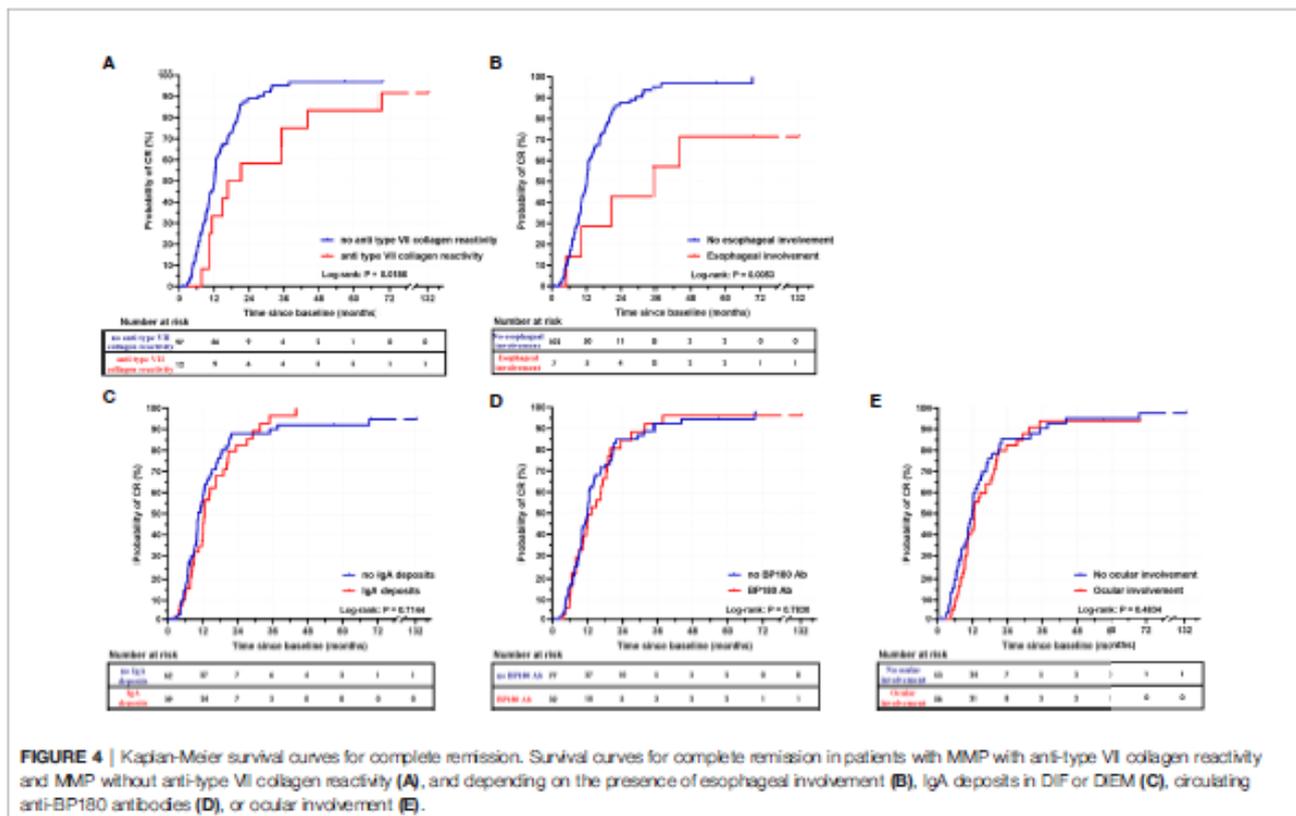
At the end of the follow-up, the CR rate was not significantly different between patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity and other patients ($P > 0.9999$). Nevertheless, patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity had required significantly more RTX cycles/injections ($P = 0.0186$) than other patients with MMP to achieve CR (Figure 5).

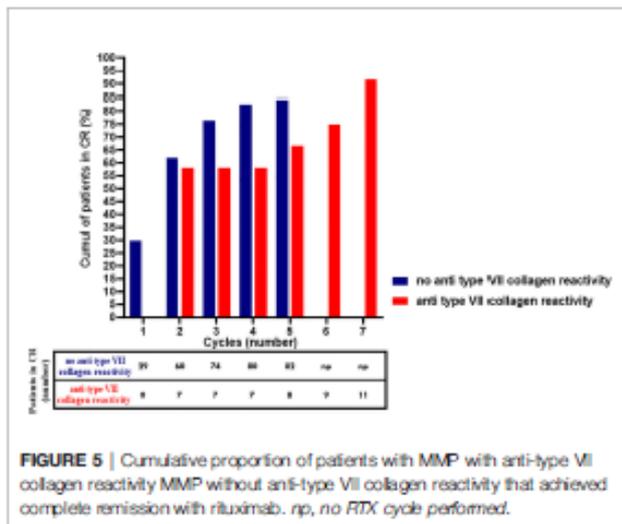
Factors Associated With Relapse in Remittent Patients With MMP After RTX

Univariate analyses aiming to identify factors associated with the relapse at the 6-month follow-up after CR included 86 patients, 68 of whom did not relapse and 13 of whom did (Table 6). No parameter was found significantly associated with the relapse in univariate and multivariate analyses.

DISCUSSION

RTX is a murine-human chimeric monoclonal antibody directed against CD20, a cell surface marker expressed by B cells after the late pre B-cell stage (except plasma cells), and is responsible for prolonged B-cell depletion followed by a 6-month delayed recovery period (19, 20). Following clinical trials, meta-analyses, and a prospective multicenter randomized trial (21–24), RTX is now recommended in first line therapy for moderate to severe pemphigus in combination with oral corticosteroids (25, 26). RTX has also been used off-label, alone or in





combination therapies, with success in a wide range of other refractory AIBDs, including MMP (10, 11, 27, 28). Herein, we reported a large monocentric retrospective real-life series of patients with MMP treated with RTX without conventional ISAs. We established that RTX in association with immunomodulatory drugs is an effective therapeutic option in severe and/or refractory MMP, achieving a cumulative CR rate of 85.3% after one or multiple cycles. Our series provides a large contribution to the field as 109 patients were included with a long-term follow-up of 51.4 months (median). In comparison, the largest study to date on patients with MMP treated with biologics was a recent systematic review from Lytvyn et al. (11). This review involved 63 studies and included 331 patients, 112 of whom were treated with RTX, and some of them concomitantly received conventional ISAs (10, 27).

Limitations

Since MMP is rare, there is a limitation regarding the number of patients that can be recruited in studies. Our study was retrospective, covering a period of 10 years that corresponded to a change in our therapeutic management of patients with MMP since concomitant treatments with RTX (conventional ISAs) were stopped in the center to avoid side effects. This study was monocentric, performed on a cohort of patients followed up in a French referral center for AIBD, that ensures a homogenous management by a multidisciplinary team regarding systematic evaluation, diagnoses, and therapeutic schedule for RTX and concomitant therapies. Despite screening 121 patients for inclusion, this monocentric setting might have led to a loss of statistical power. Since patients were referred from other centers in France or nearby countries, this might have induced loss of sight when patients wished to continue their follow-up closer to their home, and might have therefore caused the exclusion of some cases or shortened follow-up duration. Nevertheless, 109 patients were included with a median follow-up duration >4 years. Since non-responders with severe MMP might have received a second RTX cycle 3 months after baseline on an individual basis (see Methods), this might have resulted in the

administration of different RTX regimens according to disease severity. This indication bias might have reduced our chance to identify clinical factors influencing the response to RTX as severely affected patients underwent more RTX injections during the first year of follow-up.

Comparison of the Study Population With Previous Literature

Our study population had similar epidemiologic characteristics as those in previous studies; there was a predominance of females (11, 29–31) as well as diseases lasting for several years before RTX therapy since MMP diagnosis had been delayed for several months to years (28, 30, 32). The median age at MMP diagnosis (69.7 years) was in line with average values reported in other studies (3, 9, 31), but was higher than that in the systematic review by Lytvyn et al. (11). At the time of diagnosis, the most common sites involved in our study in decreasing order of frequency were nasopharyngeal, oral, ocular, laryngeal, genital, and anal MM, which was comparable with previous findings (1, 30, 31, 33), apart from a higher proportion of nasopharyngeal involvement. In comparison with the study by Lytvyn et al., our series had less frequent ocular involvement (59.6% vs. 70.1%) but more frequent laryngo-tracheal (49.5% vs. 23.9%) and buccal involvement (65.1 vs. 39%), in line with previous publications by our multidisciplinary team (34). These differences might be a consequence of the large amount of studies involving ocular monosite MMP in the review by Lytvyn et al. and from center specificities in the multidisciplinary evaluation; notably, patients with MMP were systematically examined by a stomatologist, an ophthalmologist, and an otorhinolaryngologist in our referral center, which might explain higher rates of ENT involvement considering that the latter might be asymptomatic (34, 35). The rate of skin involvement was similar to that in previous studies (3). The proportion of patients with MMP having symptomatic esophageal disease was higher in this series (8.3%) than in our previous retrospective study that included 477 patients with MMP (36).

The population study demonstrated similar severity in comparison with other retrospective studies including patients with MMP, considering the proportion of severe disease (95.4%), patients with ≥ 3 sites (67.0%) at diagnosis, and patients with multisite involvement (64.2%) at baseline (9, 10, 27, 30). Regarding therapeutics prior to baseline, fewer patients had been treated with systemic corticosteroids in our study (11.0%) in comparison with the pooled population from the systematic review (11). This discrepancy resulted from local management guidelines aimed at preventing long-term use of corticosteroids and its inherent complications, according our previous therapeutic experience with MMP (9, 10). A much larger proportion of our patients had experienced failure with immunomodulatory therapies (80.7%) and conventional ISAs (66.1%) in comparison with the patients included in the systematic review (35.0% and 46.5%, respectively); however, these therapies had reduced the number of sites affected at baseline (median: 2 sites) in comparison with diagnosis (median value: 3 sites).

Interestingly, in comparison with the 25.1% of patients who received concomitant ISAs with RTX therapy as reported in the

TABLE 6 | Univariate analysis: factors associated with relapse within 6 months after complete response in 86 patients with MMP.

Variables	All CR* N = 81		No relapse N = 68		Relapse N = 13		P-value**
Female gender, N (%)	45	(52.3)	41	(56.2)	4	(30.8)	0.1323
Age at diagnosis (years), median (IQR)	69.7	(19.8)	69.7	(19.2)	74.0	(25.2)	0.6042
Delay between symptoms and diagnosis (months), median (IQR)	14.8	(29.5)	14.6	(30.4)	16.5	(27.8)	0.6211
Immune deposits at BMZ in DIF							
IgG, N (%) [†]	62	(7.5)	53	(77.9)	9	(69.2)	0.4909
IgA, N (%) [†]	33	(40.7)	28	(41.2)	5	(38.5)	>0.9999
IgG and IgA, N (%) [†]	26	(32.1)	22	(32.4)	4	(30.8)	>0.9999
Exclusive IgA, N (%) [†]	7	(8.6)	6	(8.8)	1	(7.7)	>0.9999
C3, N (%) [†]	65	(76.5)	54	(79.4)	8	(61.5)	0.2980
MMP with anti-type VII collagen reactivity, N (%)	10	(11.6)	8	(11.0)	2	(15.4)	0.6436
Anti-BP180 positivity, N (%)	25	(35.2)	22	(36.7)	3	(27.3)	0.5330
Mucosal involvement only at diagnosis, N (%)	42	(59.2)	37	(61.7)	5	(45.5)	0.6092
Ocular monosite MMP, N (%)	12	(14.0)	9	(12.3)	3	(27.1)	0.3805
Severe MMP, N (%)	83	(96.5)	70	(95.9)	13	(100)	>0.9999
Therapeutic lines before baseline							
Immunomodulatory drugs [‡] , N (%)	68	(79.1)	56	(76.7)	12	(92.3)	0.2847
DDS/sulfazopyrine, N (%)	57	(66.3)	47	(64.4)	10	(76.9)	0.5290
ISA, N (%)	57	(66.3)	46	(63.0)	11	(84.6)	0.2035
Cyclophosphamide, N (%)	44	(51.2)	34	(46.8)	10	(76.9)	0.0690
Previously experience CR before RTX, N (%)	8	(9.3)	7	(9.6)	1	(7.7)	>0.9999
Age at baseline (years), median (IQR)	70.9	(17.7)	70.9	(17.1)	74.3	(20.6)	0.5875
Time duration between first symptoms and baseline (months), median (IQR)	36.3	(60.9)	38.5	(62.2)	32.2	(38.1)	0.5466
Time duration between diagnosis and baseline (months), median (IQR)	6.8	(14.9)	6.1	(16.3)	8.5	(12.8)	0.4658
RTX indication							
Refractory/contraindication to immunomodulatory drugs, N (%)	69	(80.2)	57	(78.1)	12	(92.3)	0.1727
Refractory to ISA, N (%)	56	(65.2)	45	(61.6)	11	(84.6)	0.1286
Time duration of ISA treatment (months), median (IQR)	3.5	(6.5)	3.0	(7.0)	5.0	(3.7)	0.9616
Contraindication to conventional ISA, N (%)	19	(22.1)	18	(24.7)	1	(7.7)	0.2810
Baseline involvement							
Number of sites involved, median (IQR)	2.0	(2.0)	2.0	(2.0)	2.0	(3.0)	0.9056
Ocular, N (%)	42	(48.8)	35	(47.9)	7	(53.8)	0.9276
Laryngeal, N (%)	37	(43.0)	32	(43.8)	5	(38.5)	0.9549
Buccal, N (%)	55	(64.0)	46	(63.0)	9	(69.2)	0.7623
Skin, N (%)	26	(30.2)	22	(30.1)	4	(30.8)	>0.9999
Genital, N (%)	11	(12.8)	9	(12.3)	2	(15.4)	0.6698
Anal, N (%)	9	(10.5)	8	(11.0)	1	(7.7)	>0.9999
Esophagus, N (%)	5	(5.8)	4	(5.5)	1	(7.7)	0.5687
≥1 site involved, N (%)	61	(70.9)	52	(71.2)	9	(69.2)	>0.9999
≥2 sites involved, N (%)	36	(41.9)	31	(42.5)	5	(38.5)	>0.9999
Baseline activity MMPDAI score, median (IQR)	11.0	(13.0)	11.5	(13.2)	10.5	(12.5)	0.6641
Concomitant treatments at baseline							
Immunomodulatory drugs [‡] , N (%)	64	(74.4)	53	(72.6)	11	(84.6)	0.5005
DDS and/or sulfazopyrine, N (%)	55	(64.0)	45	(61.7)	10	(76.9)	0.3608
Systemic corticosteroid, N (%)	2	(2.3)	2	(2.7)	0	(0)	>0.9999
Topical corticosteroids [‡] , N (%)	14	(16.3)	12	(16.4)	2	(15.4)	>0.9999
Less than 4 months between the two first cycles, N (%)	16	(20.8)	13	(20.0)	3	(25.0)	0.7055
Time to CR (months), median (IQR)	11.7	(9.0)	11.8	(9.2)	11.4	(5.8)	0.6863
Number of RTX cycles to achieve CR, median (IQR)	2.0	(2.0)	2.0	(2.0)	2.0	(1.2)	0.6586
Number of RTX injections to achieve CR, median (IQR)	4.0	(4.0)	4.0	(3.2)	4.0	(3.2)	0.6823
Concomitant immunomodulatory drugs after baseline, N (%)	84	(97.7)	71	(97.3)	13	(100.0)	>0.9999
Initiation/resumption of DDS/sulfazopyrine after baseline, N (%)	25	(29.1)	22	(30.1)	3	(23.1)	0.7480

CR, complete remission; IQR, interquartile range; BMZ, basement membrane zone; DIF, direct immunofluorescence; Ab, antibody; MMP, mucous membrane pemphigoid; DDS, dapsone; ISA, immunosuppressive agents; RTX, rituximab; MMPDAI, mucous membrane pemphigoid disease activity index. *Only the 86 patients with MMP and more than 6 months of follow-up after complete response were included in this analysis. **Univariate comparison analyses between the CR and non-CR groups. †based on 81 cases; ‡i.e., DDS, Sulfasalazine, doxycycline or equivalent, hydroxychloroquine, acetone or colchicine; †cutaneous application of more than 10g/d of high potent topical corticosteroids.

systematic review (11), only 4.6% of our patients received concomitant systemic corticosteroids and none received other ISAs. Contrastingly, a higher proportion of patients received concomitant immunomodulatory drugs (78.0% vs. 15.1%). Thus, this series allowed us to better evaluate RTX efficacy in combination with immunomodulatory drugs.

Outcomes of Patients With MMP Treated With RTX and Factors Associated With the Outcomes

DC is rarely analyzed in studies on MMP. The percentage of patients that achieved DC in our series (89%) was lower than the DC rate of 100% reported in a previous study involving patients

receiving RTX and conventional therapies, including immunosuppressants (27). Nevertheless, the DC rate in our study was higher compared to those reported in studies by Lamberts et al. and Rashid et al. (67.9% and 81%, respectively) (28, 33). The median survival time to DC (7.1 months) in our series was shorter than the average time to DC (10.2 months) reported by Maley et al., but was longer than the 14.5 weeks reported by Lamberts et al. (28). We used Kaplan-Meier curves to estimate the median survival in order to take into account the disparity of follow-up times and censored patients; this might explain the difference in median time observed in those studies. Regarding DC according to sites, we found that laryngeal involvement had a longer median survival time than the other sites involved. Moreover, the larynx was still affected in 31% of patients without CR at the last follow-up. These results support other studies highlighting that laryngeal involvement may be more refractory to RTX (37). The conjunctivae was the site with the second longest median survival time to DC (6.3 months), which was close to the median survival times of buccal and genital involvement (5.7 months). Thus, ocular lesions did not take longer to heal than other mucosal sites such as buccal or genital mucous membrane, as suggested in previous studies (9, 38, 39).

RTX regimen and concomitant therapies differ in retrospective studies reporting RTX efficacy in patients with MMP, making it difficult to compare the resolution outcomes (10, 11, 27, 28). Only 4.6% of patients were non-responders to RTX and 95.4% were responders (85.3% with CR; 10.1% with partial response) in our series. These results are similar to those of a previous study at our center, which reported 92% of responder patients after one or two RTX cycles (10). Nevertheless, the RTX regimen differed between the two studies and the median number of RTX cycles received was higher in the current one. The definition of CR also differed between the two studies and required to have complete healing and no new lesions for 2 months in the current one. Besides, a second cycle of RTX was systematically proposed 4 to 6 months after baseline in non-CR patients to achieve CR and 6 months after baseline in CR patients to consolidate the remission in the current series. These parameters might explain why the CR rate after a unique cycle was 68% in the previous study and only 26.6% in the current one. The proportion of responders (95.4%) is notably much higher than that reported in the study by Lamberts et al. (57.1%) which applied a similar regimen with RTX injections at baseline, 6 and 12 months, but with lower dosage (500 mg) of RTX after baseline (28). The number, frequency, and dosage of RTX injections after baseline might thus influence the response in patients with MMP. However, we could not test this hypothesis in this study due to the indication bias that was responsible for a more aggressive regimen in some initial non-responders.

Overall, the cumulative CR rate we achieved (85.3%) was similar to that reported in our previous study (10). CR was achieved after two RTX cycles (median), corresponding to four RTX infusions (median), which confirmed our previous observations regarding the benefit of completing at least two RTX cycles in patients with MMP (10). In patients who were

non-responders or partial responders after the first two cycles, repeated RTX cycles increased the CR rate subsequently (Figure 3). The cumulative proportion of CR (85.3%) was higher than that reported in the systematic review by Lytvyn et al. (70.5%), whereas the proportion of non-responders was similar (5.4%) (11). Our population study showed similar severity in comparison with the literature, and much fewer patients received concomitant ISA, whereas the proportion of patients receiving immunomodulatory drugs was higher (11). Thus, the use of concomitant immunomodulatory drugs might have contributed to this difference in the proportion of CR between our study and the previous review (11). The median time taken to achieve CR was similar (12.2 months vs. 10.1 months) considering the differences in outcome definition and in the calculation methods; notably, the definition of CR we used required the absence of lesions for 2 months.

While it has been suggested in recent guidelines to avoid differentiating subtypes of MMP (2), we found a significant difference ($p = 0.0186$) in the median survival time to achieve CR between patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity (16.6 months) and those with MMP without anti-type VII collagen reactivity (12.1 months), although there was no significant difference in the percentage of patients achieving DC and CR. Patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity required more RTX cycles to achieve DC and CR, both of which took longer to achieve. This difference was not found in a study comparing MMP and EBA outcomes that included less patients (28). We believe that this finding is important as MMP with anti-type VII collagen reactivity patients seem more difficult to control in our experience. Thus, repeating RTX cycles in patients with MMP with anti-type VII collagen reactivity and waiting for progressive improvement until CR might constitute a preferred option in cases of severe or refractory disease, rather than shifting to another ISA-based therapy. Notably, all of our five patients with therapeutic failure had MMP without anti-type VII collagen reactivity and only one achieved a better outcome after RTX was replaced by a combination therapy of anti-TNF α and IVIG.

To our knowledge, only a few studies with smaller sample sizes have investigated factors that might be associated with a poorer response to RTX in patients with multisite MMP (28). As described above, statistical analyses might suffer from a lack of power considering the number of patients included and the indication bias that predisposed non-responder patients with severe disease to receive the second RTX cycle earlier and undergo more RTX cycles within the first year. These limitations possibly prevented us from identifying more factors significantly associated with CR at the 8-month follow-up in univariate analyses. None of the parameters studied demonstrated P -values <0.05 in univariate analyses. Notably, a higher percentage of patients that did not achieve CR at the 8-month follow-up had ocular involvement (55.4% vs. 40.7%) but the ocular involvement was not significantly associated with CR status in univariate analysis ($P = 0.1919$) and multivariate analysis. As stated above, patients with ocular involvement had received significantly more RTX injections during the first year

of the follow-up which might have biased the results. The median activity score of MMPDAI differed according to CR status at 8 months (11.7 vs. 7.0) but was not significantly associated with CR status after 8 months of follow-up in univariate analysis ($p = 0.1478$). As stated in the 2015 consensus statement, the MMPDAI score is a validated score that is suitable for use by dermatologists and multidisciplinary teams for milder forms of MMP (12). As other scores assessing monosite or multisite MMP activity, MMPDAI does not consider laryngo-tracheal lesions. As laryngeal involvement was present in 39.4% of our patients at baseline and considering that this location demonstrated the longest time taken to achieve DC, a score integrating laryngeal activity might have provided significant information. Scores other than MMPDAI do exist, notably for specific site scoring, and some adapted scores were used in previous studies (3, 9, 40); however, we favored the use of the validated scoring system. Nevertheless, in multivariate analyses the time between the first symptoms and baseline, the MMPDAI score at baseline and being refractory to conventional ISAs were significantly associated with the absence of CR at 8-months follow-up. Considering the small sample size and the R-squared value, these results should be interpreted with caution and should be confirmed in unbiased cohorts.

Whereas some studies found IgA-dominant cases to have poorer outcomes (28), our analyses regarding IgA deposits did not find this parameter to be associated with CR status and time to CR did not differ significantly in patients with IgA deposits.

The relapse rate in this study was similar to those reported in the literature (10, 27). As described in shorter series, most patients achieved CR again (91.7%) after relapse in a short time with a median number of one RTX cycle.

After CR, RTX was carefully stopped, following which immunomodulatory drugs were progressively tapered up to the doses defined as minimal therapy in the consensus conference. The therapeutic schedule in our center did not include the cessation of immunomodulatory drugs to prevent relapses. The RTX schedule, which comprised a consolidation injection after CR, allowed 58.7% of the 109 patients to achieve CR off RTX (68.8% of patients in CR) and 22.0% of patients to achieve CR off RTX with minimal therapy (25.8% of patients in CR). These results highlight that our RTX regimen and therapeutic schedule allowed a majority of severe and resistant patients to pass a milestone and to be subsequently controlled by non-immunosuppressive treatment with a better tolerance profile than conventional ISAs or corticosteroids. Comparing the treatment schedule with other published studies is delicate. Notably, RTX reinjection at 6 and 12 months has been performed in some of these studies (28, 33) but it is difficult to ascertain that these injections were administered to CR patients, whereas our protocol comprised RTX cycles every 6 months until CR followed by a unique infusion 6 months later to consolidate the CR. At the last follow-up, 36.8% of patients achieved CR off RTX with doses of immunomodulatory drugs superior to those defined as minimal therapy (43.0% of patients in CR) for a time duration up to 101.3 months, showing that some patients required long-term administration of high doses of these drugs to prevent relapse. Finally, 26.6% of patients with MMP remained in CR on RTX

(31.2% of patients in CR). The median time spent by these patients in CR on RTX at the last follow-up was 11.7 months, but it ranged from 0.7 to 78.9 months; this highlights that some of these patients received RTX injections intermittently on a long-term basis to prevent relapse in severe or difficult-to-control cases. In these specific patients, chronic reinjection of RTX over several years to maintain CR or PR may raise concerns about its financial sustainability, and a careful assessment of long-term tolerance is required with respect to this specific population.

RTX Tolerance: Adverse Events

Our series reported a high rate of adverse events (46.8%), but only 21.1% of patients had severe adverse events. Notably, a high percentage of patients receiving RTX had lymphopenia without disturbance in other hematopoietic cell lineages, which mainly occurred after the first cycle of RTX in patients previously having received cyclophosphamide. Lymphopenia and secondary malignancies are well-known complications of cyclophosphamide use (9, 41), whereas they are uncommon adverse events associated with RTX use in AIBD (42). Previous therapies received by aged population of patients with MMP as well as long term follow-up might have thus contributed to the reported adverse event rates. The 5.5% rate of incident cancer in our current series was similar to that reported in other large series (30). Moreover, a higher cancer prevalence (11.7%) had been reported previously in a French multicenter retrospective cohort of patients with MMP and was found to not differ from the general population within the same age range in France (43). In concordance with this study (43), a higher incidence of cancer was not found in patients having anti-laminin 332 antibodies in our studies, whereas it was suggested in other cohorts of patients with MMP (30, 31, 44). Non-infectious and infectious adverse events reported in our cohort included those commonly reported with RTX, notably in other AIBDs such as pemphigus (42). The percentage of patients with infectious pneumonia adverse events was higher than in other cohorts (11, 28). The latter might have been increased by the COVID-19 pandemic that occurred in 2019; in this regard, a study in France previously reported that patients with AIBD receiving RTX had a 5-fold higher incidence of COVID-19 infection than patients who did not receive RTX during the first COVID-19 wave (45). Patients with AIBD with COVID-19 also demonstrated a 5.9-fold higher risk of dying (45), but no patient in this series had fatal issues. Finally, the incidences of infectious adverse events and pneumonia were lower than those reported in a study that explored their incidence according to age in a series of patients with auto-immune diseases receiving RTX (46).

In conclusion, RTX associated with immunomodulatory drugs is an effective and safe treatment in refractory and severe MMP, achieving DC in 89.0% of cases in 7.2 months and CR in 85.3% of cases after two cycles of RTX in 12.2 months. Similar values of high efficacy have been obtained with RTX in other AIBD such as pemphigus (24). RTX therapy in patients with MMP might be more effective than in those with bullous pemphigoid (47, 48). Although 38.7% of patients experienced relapse, CR off RTX was achieved in 68.8% of patients that had CR, whereas CR with minimal therapy was only achieved in 31.2% of them. Thus, RTX allowed

patients with MMP in therapeutic impasse to pass a milestone. Our findings indicate that the continuation of immunomodulatory drugs may be mandatory to maintain patients in a state of long-term remission. Prospective comparative studies are required to confirm these results and define the position of RTX in the therapeutic armamentarium for MMP. Important information might notably be obtained from an ongoing phase 3 clinical trial comparing the safety and effectiveness of RTX vs oral cyclophosphamide in MMP (NCT 03295383).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité local d'éthique pour la recherche clinique des HUPSSD Avicenne-Jean Verdier-René Muret, CH Avicenne, AP-HP, Bobigny, France (#CLEA-2022-236). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

REFERENCES

- Chan IS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, et al. The First International Consensus on Mucous Membrane Pemphigoid: Definition, Diagnostic Criteria, Pathogenic Factors, Medical Treatment, and Prognostic Indicators. *Arch Dermatol* (2002) 138:370–9. doi: 10.1001/archderm.138.3.370
- Schmidt E, Rashid H, Marzano AV, Lamberts A, Di Zenzo G, Diercks GFH, et al. European Guidelines (S3) on Diagnosis and Management of Mucous Membrane Pemphigoid, Initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology – Part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2021) 35:1926–48. doi: 10.1111/jdv.17395
- Rashid H, Lamberts A, Borradori L, Alberti-Violetti S, Barry RJ, Caproni M, et al. European Guidelines (S3) on Diagnosis and Management of Mucous Membrane Pemphigoid, Initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology – Part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2021) 35:1750–64. doi: 10.1111/jdv.17397
- Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A, Morales-Garcia P, Mesa-Aguado F, Bascones-Martinez A, et al. Treatment of Severe Erosive Gingival Lesions by Topical Application of Clobetasol Propionate in Custom Trays. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (2003) 95:688–92. doi: 10.1067/moe.2003.139
- Carrozzo M, Arduino P, Bertolusso G, Cozzani E, Parodi A. Systemic Minocycline as a Therapeutic Option in Predominantly Oral Mucous Membrane Pemphigoid: A Cautionary Report. *Int J Oral Maxillofac Surg* (2009) 38:1071–6. doi: 10.1016/j.ijom.2009.06.021
- Hegarty AM, Ormond M, Sweeney M, Hodgson T. Dapsone Efficacy and Adverse Events in the Management of Mucous Membrane Pemphigoid. *Eur J Dermatol* (2010) 20:223–4. doi: 10.1684/ejd.2010.0847
- Musette P, Pascal F, Hoang-Xuan T, Heller M, Lok C, Deboise A, et al. Treatment of Cicatricial Pemphigoid With Pulse Intravenous Cyclophosphamide. *Arch Dermatol* (2001) 137:101–2.
- Friedman J, Marcovich AL, Kleinmann G, Schattner A. Low-Dose Pulsed Intravenous Cyclophosphamide for Severe Ocular Cicatricial Pemphigoid in

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MA, GB, CP, and PM contributed to the conception and the design of the study. MA, CL-V, GB, LR, CZ, BM, FC, and CP handled the patients' daily care and dermatological data collection. ISo was involved in ENT assessment and data collection. SD and EG performed ophthalmological assessment and data collection. ISi performed stomatological assessment and data collection. FM and SG-M performed the serum immunological analyses. MH, NL, and CP performed direct immunoelectron microscopy. GB, MA, and BM reviewed the charts of the patients and organized the databases. GB and JS performed the statistical analysis and figures. GB wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision and have read and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Françoise Aucouturier who has been involved for many years in the immunological analyses that allowed the diagnosis of the patients in this cohort. Our thoughts are also with Francis Pascal, who recently passed away, and who contributed for many years to the stomatological evaluation, follow-up, and treatment of these patients.

- Elderly Patients. *Cornea* (2014) 33:1066–70. doi: 10.1097/ICO.000000000000168
- Munyangango EM, Le Roux-Villet C, Doan S, Pascal F, Soued I, Alexandre M, et al. Oral Cyclophosphamide Without Corticosteroids to Treat Mucous Membrane Pemphigoid. *Br J Dermatol* (2013) 168:381–90. doi: 10.1111/bjd.12041
- Le Roux-Villet C, Prost-Squarcioni C, Alexandre M, Caux F, Pascal F, Doan S, et al. Rituximab for Patients With Refractory Mucous Membrane Pemphigoid. *Arch Dermatol* (2011) 147:843–49. doi: 10.1001/archdermatol.2011.54
- Lytvyn Y, Rahat S, Mufli A, Witol A, Bagit A, Sachdeva M, et al. Biologic Treatment Outcomes in Mucous Membrane Pemphigoid: A Systematic Review. *J Am Acad Dermatol* (2021). doi: 10.1016/j.jaad.2020.12.056
- Murrell DF, Marinovic B, Caux F, Prost C, Ahmed R, Wozniak K, et al. Definitions and Outcome Measures for Mucous Membrane Pemphigoid: Recommendations of an International Panel of Experts. *J Am Acad Dermatol* (2015) 72:168–74. doi: 10.1016/j.jaad.2014.08.024
- Gaudin O, Seta V, Alexandre M, Bohelay G, Aucouturier F, Mignot-Grootenboer S, et al. Gliptin Accountability in Mucous Membrane Pemphigoid Induction in 24 Out of 313 Patients. *Front Immunol* (2018) 9:1030. doi: 10.3389/fimmu.2018.01030
- Seta V, Aucouturier F, Bonnefoy J, Le Roux-Villet C, Pendaries V, Alexandre M, et al. Comparison of 3 Type VII Collagen (C7) Assays for Serologic Diagnosis of Epidermolysis Bullosa Acquisita (EBA). *J Am Acad Dermatol* (2016) 74:1166–72. doi: 10.1016/j.jaad.2016.01.005
- Grootenboer-Mignot S, Descamps V, Picard-Dahan C, Nicaise-Roland P, Prost-Squarcioni C, Leroux-Villet C, et al. Place of Human Amniotic Membrane Immunoblotting in the Diagnosis of Autoimmune Bullous Dermatoses. *Br J Dermatol* (2010) 162:743–50. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09566.x
- Foster CS, Wilson LA, Ekins MB. Immunosuppressive Therapy for Progressive Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Ophthalmology* (1982) 89:340–53. doi: 10.1016/s0161-6420(82)34791-0
- Prost-Squarcioni C, Caux F, Schmidt E, Jonkman MF, Vassileva S, Kim SC, et al. International Bullous Diseases Group: Consensus on Diagnostic Criteria

- for Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Br J Dermatol* (2018) 179:30–41. doi: 10.1111/bjd.16138
18. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) | Protocol Development | CTEP*. Available at: https://ctep.cancer.gov/protocol-development/electronic_applications/ctc.htm#ctc_50 (Accessed March 27, 2022).
 19. Butler LA, Tam CS, Seymour JF. Dancing Partners at the Ball: Rational Selection of Next Generation Anti-CD20 Antibodies for Combination Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia in the Novel Agents Era. *Blood Rev* (2017) 31:318–27. doi: 10.1016/j.blre.2017.05.002
 20. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA, et al. Mouse CD20 Expression and Function. *Int Immunol* (2004) 16:119–29. doi: 10.1093/intimm/dkh009
 21. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet* (2019) 394:882–94. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31778-7
 22. 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) 357:545–52. doi: 10.1056/NEJMoa067752
 23. Ahmed AR, Nguyen T, Kavari 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. doi: 10.1016/j.intimp.2016.02.013
 24. 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. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30070-3
 25. Murrell DF, Peña S, Joly P, Marinovic B, Hashimoto T, Diaz LA, et al. Diagnosis and Management of Pemphigus: Recommendations of an International Panel of Experts. *J Am Acad Dermatol* (2020) 82:575–85.e1. doi: 10.1016/j.jaad.2018.02.021
 26. Lim YL, Bohelay G, Hanakawa S, Musette P, Janela B. Autoimmune Pemphigus: Latest Advances and Emerging Therapies. *Front Mol Biosci* (2021) 8:808536. doi: 10.3389/fmolb.2021.808536
 27. Maley A, Warren M, Haberman I, Swerlick R, Kharod-Dholakia B, Feldman R. Rituximab Combined With Conventional Therapy Versus Conventional Therapy Alone for the Treatment of Mucous Membrane Pemphigoid (MMP). *J Am Acad Dermatol* (2016) 74:835–40. doi: 10.1016/j.jaad.2016.01.020
 28. Lamberts A, Euverman HI, Terra JB, Jonkman MF, Horváth B. Effectiveness and Safety of Rituximab in Recalcitrant Pemphigoid Diseases. *Front Immunol* (2018) 9:248. doi: 10.3389/fimmu.2018.00248
 29. Hübner P, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany. *J Invest Dermatol* (2016) 136:2495–8. doi: 10.1016/j.jid.2016.07.013
 30. Rashid H, Meijer JM, Bolling MC, Diercks GFH, Pas HH, Horváth B. Insights Into Clinical and Diagnostic Findings as Well as Treatment Responses in Patients With Mucous Membrane Pemphigoid: A Retrospective Cohort Study. *J Am Acad Dermatol* (2022) 186:721–723. doi: 10.1016/j.jaad.2021.11.061. S0190-9622(21)02958-3.
 31. van Beek N, Kridin K, Bühler E, Kochan AS, Ständer S, Ludwig RJ, et al. Evaluation of Site- and Autoantigen-Specific Characteristics of Mucous Membrane Pemphigoid. *JAMA Dermatol* (2022) 158:84–9. doi: 10.1001/jamadermatol.2021.4773
 32. Radford CF, Rauz S, Williams GP, Saw VPJ, Dart JKG. Incidence, Presenting Features, and Diagnosis of Cicatrizing Conjunctivitis in the United Kingdom. *Eye (Lond)* (2012) 26:1199–208. doi: 10.1038/eye.2012.119
 33. Rashid H, Meijer JM, Bolling MC, Horváth B. Clinical Response to Rituximab and Improvement in Quality of Life in Patients With Bullous Pemphigoid and Mucous Membrane Pemphigoid. *Br J Dermatol* (2021) 186:721–3. doi: 10.1111/bjd.20881
 34. Alexandre M, Brette M-D, Pascal F, Tsianakas P, Fraïtag S, Doan S, et al. A Prospective Study of Upper Aerodigestive Tract Manifestations of Mucous Membrane Pemphigoid. *Medicine (Baltimore)* (2006) 85:239–2. doi: 10.1097/01.md.0000231954.08350.52
 35. Higgins TS, Cohen JC, Sinacori JT. Laryngeal Mucous Membrane Pemphigoid: A Systematic Review and Pooled-Data Analysis. *Laryngoscope* (2010) 120:529–36. doi: 10.1002/lary.20763
 36. Zehou O, Raynaud J-J, Le Roux-Villet C, Alexandre M, Airinei G, Pascal F, et al. Oesophageal Involvement in 26 Consecutive Patients With Mucous Membrane Pemphigoid. *Br J Dermatol* (2017) 177:1074–85. doi: 10.1111/bjd.15592
 37. Baniel A, Oestreich-Kedem Y, Peled A, Bar-Ilan E, Geller S, Sprecher E, et al. Laryngeal Mucous Membrane Pemphigoid Serves as a Prognostic Factor for Poor Response to Treatment With Rituximab. *Clin Exp Dermatol* (2021) 46:915–9. doi: 10.1111/ced.14662
 38. Elder MJ, Lightman S, Dart JK. Role of Cyclophosphamide and High Dose Steroid in Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Br J Ophthalmol* (1995) 79:264–6. doi: 10.1136/bjo.79.3.264
 39. Durran K, Papaliodis GN, Foster CS. Pulse IV Cyclophosphamide in Ocular Inflammatory Disease: Efficacy and Short-Term Safety. *Ophthalmology* (2004) 111:960–5. doi: 10.1016/j.ophtha.2003.08.034
 40. Lee BWH, Tan JCK, Radjenovic M, Coroneo MT, Murrell DF. A Review of Scoring Systems for Ocular Involvement in Chronic Cutaneous Bullous Diseases. *Ophthalmol J Rare Dis* (2018) 13:83. doi: 10.1186/s13023-018-0823-5
 41. Thorne JE, Woreta FA, Jabs DA, Anhalt GJ. Treatment of Ocular Mucous Membrane Pemphigoid With Immunosuppressive Drug Therapy. *Ophthalmology* (2008) 115:2146–52.e1. doi: 10.1016/j.ophtha.2008.08.002
 42. Bohelay G, Caux F, Musette P. Clinical and Biological Activity of Rituximab in the Treatment of Pemphigus. *Immunotherapy* (2021) 13:35–53. doi: 10.2217/imt-2020-0189
 43. Bernard P, Antonicelli F, Bedane C, Joly P, Le Roux-Villet C, Duvert-Lehembre S, et al. Prevalence and Clinical Significance of Anti-Laminin 332 Autoantibodies Detected by a Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Mucous Membrane Pemphigoid. *JAMA Dermatol* (2013) 149:533–40. doi: 10.1001/jamadermatol.2013.1434
 44. Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, Yee C, Coté T, Yancey KB. Anti-Epiligrin Cicatricial Pemphigoid and Relative Risk for Cancer. *Lancet* (2001) 357:1850–1. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04971-0
 45. Joly P. Incidence and Severity of COVID-19 in Patients With Autoimmune Blistering Skin Diseases: A Nationwide Study. *J Am Acad Dermatol* (2022) 86:494–7. doi: 10.1016/j.jaad.2021.10.034
 46. Mielnik P, Sexton J, Lie E, Bakland G, Loli LP, Kristianslund EK, et al. Does Older Age Have an Impact on Rituximab Efficacy and Safety? Results From the NOR-DMARD Register. *Drugs Aging* (2020) 37:617–26. doi: 10.1007/s40266-020-00782-x
 47. Yoo DS, Lee JH, Kim S-C, Kim JH. Mortality and Clinical Response of Patients With Bullous Pemphigoid Treated With Rituximab. *Br J Dermatol* (2021) 185:210–2. doi: 10.1111/bjd.19890
 48. Berhani N, Joly P, Golinski M-L, Colliou N, Lim A, Larbi A, et al. B-Cell Depletion Induces a Shift in Self Antigen Specific B-Cell Repertoire and Cytokine Pattern in Patients With Bullous Pemphigoid. *Sci Rep* (2019) 9:3525. doi: 10.1038/s41598-019-40203
- Conflict of Interest:** GB, MA, CL-V, FC, CP-P, and PM were investigators in the “Ritux 3” study (NCT00784589) and the “Pemphix” trial (NCT02383589) conducted by Roche Laboratories. MA, CL-V, FC, CP-P, and PM are investigators in “RTX-MMP” study (NCT03295383).
- The remaining 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.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Bohelay, Alexandre, Le Roux-Villet, Sibbon, Doan, Souad, Shourick, Rousset, Mellothe, Heller, Lièvre, Zamedzu, Morin, Grootenboer-Mignot, Gabison, Caux, Prost-Squarcioni and Musette. 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.

Annexe V



OPEN ACCESS

Edited by:

Giovanni Di Zenzo,
Istituto Dermatologico dell'Immacolata
(ID)-IRCCS, Italy

Reviewed by:

Farzan Soltani,
Charité Universitätsmedizin Berlin,
GermanyKaty Nardiyke Messingham,
University of Iowa, United States
Kyle T. Amber,
Rush University, United States

*Correspondence:

Marina Alexandre
marina.alexandre@aphp.fr†These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

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

Received: 11 February 2022

Accepted: 29 March 2022

Published: 20 April 2022

Citation:

Alexandre M, Bohélay G, Gille T,
Le Roux-Villet C, Soued I, Morin F,
Caux F, Grootenboer-Mignot S and
Prost-Squarcioni C (2022) Rapid
Disease Control in First-Line
Therapy-Resistant Mucous
Membrane Pemphigoid and
Bullous Pemphigoid with
Omalizumab as Add-On Therapy:
A Case Series Of 13 Patients.
Front. Immunol. 13:874108.
doi: 10.3389/fimmu.2022.874108

Rapid Disease Control in First-Line Therapy-Resistant Mucous Membrane Pemphigoid and Bullous Pemphigoid with Omalizumab as Add-On Therapy: A Case Series Of 13 Patients

Marina Alexandre^{1†}, Gérôme Boh lay^{1,2†}, Thomas Gille^{3,4}, Christelle Le Roux-Villet¹, Isaac Soued⁵, Florence Morin⁶, Frédéric Caux^{1,2}, Sabine Grootenboer-Mignot⁷ and Catherine Prost-Squarcioni^{1,8,9}

¹ Department of Dermatology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Avicenne Hospital, Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis, AP-HP, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France, ² Inserm UMR 1125 L2P, UFR SMBH Léonard de Vinci, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France, ³ Department of Physiology & Functional Explorations, Avicenne Hospital, Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis, AP-HP, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France, ⁴ Inserm UMR 1272 "Hypoxia & the Lung", UFR SMBH Léonard de Vinci, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France, ⁵ Department of ENT and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Avicenne Hospital, Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis, AP-HP, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France, ⁶ Department of Immunology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Saint Louis Hospital, AP-HP, Université de Paris, Paris, France, ⁷ Department of Immunology and Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (MALIBUL), Bichat Hospital, AP-HP, Université de Paris, Paris, France, ⁸ Department of Pathology, Avicenne Hospital, Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis, AP-HP, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France, ⁹ Department of Histology, UFR SMBH Léonard de Vinci, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

The role of IgE autoantibodies has been demonstrated in the pathogenesis of bullous pemphigoid for many years. Recently, omalizumab (OMZ), a humanized monoclonal anti-IgE antibody that depletes total serum IgE, has been used off-label in a few case series of bullous pemphigoids demonstrating a rapid efficacy and allowing significant improvements or complete remission as add-on therapy in first-line treatment-resistant patients. Herein, we report the largest retrospective study to evaluate OMZ effectiveness in patients with subepidermal autoimmune blistering diseases. Our series included 13 patients from a single center with bullous pemphigoid or mucous membrane pemphigoid, of whom 7 had mucous membrane involvement. OMZ was added to the unchanged immunosuppressive therapies. Detailed clinical and immunological data during the first year were collected, notably for specific anti-BP180-NC16A IgE and IgG, and the median total follow-up was 30 months (range: 3–81). Our series demonstrated that OMZ induced a significant improvement in pruritus, urticarial score, and daily blister count on day 15, allowing disease control to be achieved in a 1-month median time and complete remission (CR) in a 3-month median time in 85% of these patients previously in therapeutic impasse.

At the end of the follow-up, 31% of patients achieved CR on minimal therapy after OMZ weaning without relapses, and 54% achieved CR on OMZ continuation with a minimal dose of concomitant treatment. Two patients experienced therapeutic failure (15%). At baseline, clinical variables reflecting activity were significantly positively correlated with eosinophil blood count, total IgE serum level, specific anti-BP180 IgE and IgG. While baseline anti-BP180 IgG and specific anti-BP180 IgE were significantly positively correlated, only the two patients who experienced a therapeutic failure with OMZ did not fit with this correlation, demonstrating elevated levels of anti-BP180 IgG with no measurable BP180-specific IgE. Follow-up of immunological variables demonstrated a rapid decrease of eosinophilia towards normalization, whereas a slower decline towards negativation was observed over 1 year for anti-BP180 IgG and anti BP180 IgE in patients who responded to OMZ. This case series demonstrated that OMZ is a rapidly effective biologic therapy for refractory bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid, permitting rapid disease control and reduction of concomitant therapeutics.

Keywords: omalizumab (Xolair), mucous membrane pemphigoid (MMP), bullous pemphigoid (BP), autoimmune bullous diseases (AIBDs), autoimmune skin diseases, Immunoglobulin E (IgE), Anti-BP180 IgG, Anti-BP180 IgE

INTRODUCTION

BP180 is the target antigen of autoantibodies in several autoimmune bullous diseases (AIBDs) including bullous pemphigoid (BP) and mucous membrane pemphigoid (MMP). In BP, the pathogenicity of anti-BP180 immunoglobulin (Ig) IgG, mast cells, and eosinophils is established for a long time (1). Currently, the pathogenicity of IgE, notably directed against the non-collagenous 16 A (NC16A) region of BP180, is also well documented in BP (2). Most BP patients have elevated circulating total IgE levels and harbor both specific anti-BP180 IgG and IgE in their sera. Circulating total and specific anti-BP180 IgE levels correlate with disease severity and clinical course. Whereas association between specific IgE and clinical phenotype remained unclear with diverging results among studies, some found specific IgE to be correlated with urticarial activity/phenotype and pruritus (2–4).

In MMP, unlike BP, the direct pathogenic role of anti-BP180 autoantibodies (IgG or IgE) has not convincingly been demonstrated. The pathogenicity of specific anti-BP180 IgE has been suggested by studies demonstrating IgE binding to the basement membrane zone (BMZ) (5). Nevertheless, immunoblotting failed to detect specific anti-BP180 IgE in the serum of nine patients with MMP in a previous report (6).

Standard treatments for BP consist of topical or systemic corticosteroids (CS), often in combination with second-line adjuvant immunosuppressive/immunomodulatory therapies in refractory or severe cases (5). The recommended first-line treatment for MMP is dapsone, alone or in combination with

topical corticosteroids, in mild/moderate cases, but combination with systemic immunosuppressants must be considered in severe cases (6). In refractory cases, adjuvant treatments might be slow to achieve disease control, leading to the long-term use of CS to reduce patient discomfort. As BP and MMP mainly affect the elderly over 60 years, contraindications to second-line therapies or adverse effects of the latter are common. Therefore, therapies with a safe profile could benefit patients with MMP or BP refractory to CS as add-on therapies in association with second-line treatments or when the latter cannot be used. Considering recent advances in the understanding of the direct pathogenic role of eosinophils and anti-BP180 and BP230 IgE, eosinophil-targeted therapies and treatment interfering with specific IgE pathogenicity are beginning to be used in BP (2).

Omalizumab (OMZ), a recombinant humanized monoclonal antibody that binds the Fc portion of IgE, has been approved for the treatment of severe asthma and chronic spontaneous urticaria with a good tolerance profile (7, 8). Through various mechanisms, OMZ reduces IgE production by B cells, decreases IgE-mediated histamine release by mast cells, basophils, and eosinophils, and reduces peripheral eosinophil count (4, 9). Since Fairley et al. described the first case of a BP patient efficiently treated with OMZ in 2009, the response to OMZ therapy in BP treatment was reported only in case reports and three case series, the largest of which involved eleven patients (10–32). Overall, OMZ successfully achieved disease control in most of these patients with BP, based on a review from 2019 (33). Nevertheless, criteria are still pending to identify patients who would benefit the most from OMZ, because variables such as treatments associated with OMZ, time to assess efficacy, definition of outcome measure, and follow-up of biological variables have been variously reported in the literature. Besides, the mechanism of action of OMZ questions its therapeutic interest in AIBDs other than BP, notably in those sharing similar clinical phenotypes or antigen targets, such as MMP in which OMZ use was not reported to date to our knowledge. We report herein after a case series of 13 patients with first-line therapy-resistant BP or MMP

Abbreviations: AIBD, auto-immune blistering disease; BMZ, basement membrane zone; BP, bullous pemphigoid; BP180, bullous pemphigoid 180 kDa antigen; BP180-NC16A, non-collagenous 16 A region of BP180; BPDAL, bullous pemphigoid disease activity index; CS, corticosteroids; DIEM, direct immunoelectron microscopy; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Ig, immunoglobulin; MM, mucous membrane; MMP, mucous membrane pemphigoid; OMZ, omalizumab; PVAS, pruritus visual analog scale.

treated with OMZ, with detailed clinical, biological, and immunological follow-up over a 1-year period.

PATIENTS AND METHODS

This single-center, retrospective study was conducted on patients followed between 2014 and 2020, using the database of our referral center for AIBDs after local institutional review board approval (#CLEA-2020-140). Written informed consent for participation was not required in accordance with the French national legislation.

Standard Assessment of AIBD in Our Reference Center

All patient data were systematically recorded using a computer medical chart standardized for AIBDs. The definitive diagnosis of AIBD and its type relied on a multidisciplinary clinical assessment recording past medical history, cutaneous and mucous membrane (MM) lesions, histological and immunological tests, as previously reported (34): direct immunofluorescence (DIF) and indirect immunofluorescence (IIF), BP180-NC16A, BP230 and collagen VII enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), IgG immunoblotting performed with human amniotic membrane extract as previously described (35) and direct immunoelectron microscopy (DIEM). The multidisciplinary clinical assessment in our center included a systematic examination of ENT, oral, ocular and genital MM. In case of subepithelial AIBD (*i.e.*, linear Ig or C3 deposits along the BMZ on DIF), patients were diagnosed with BP or MMP based on clinical criteria according to the criteria of Vaillant for BP (36), the predominant involvement of MM and DIEM results when the latter could be achieved (37).

Omalizumab-Treated Patients

All patients with a diagnosis of BP or MMP who received OMZ were identified by a computer search in our database and were included in the present study.

The collegial decision to start OMZ as an off-label add-on therapy was taken considering the first reports from the literature, with the aim of achieving rapid remission of severe symptoms in patients in therapeutic impasse and/or bearing comorbidities. OMZ was added to previous treatments, of which regimen remained unchanged until disease control. OMZ dosage was calculated according to the asthma dosing nomogram, considering body weight and baseline serum total IgE level. The management of therapeutic de-escalation was the same for all cases after reaching disease control, topical CS were progressively tapered and weaned before considering OMZ and ISA tapering, to prevent relapse and achieve complete remission (CR) on minimal therapy.

Collected Data

Disease control (no new active lesions and beginning of healing of established lesions), CR (complete healing, and no active lesions for 2 months), and relapse were defined according to consensus statements (38,39). Failure of therapy with OMZ was adapted from the latter and defined as no disease control after 3 months of treatment with OMZ. Baseline was defined as the date of the first OMZ injection. At baseline

were collected: age, sex, type of AIBD, time between AIBD diagnosis and baseline, treatment lines before OMZ, and serum total IgE. Clinical, biological, and immunological data reflecting disease activity and adverse events were collected at baseline, at day 15, and then at 1, 2, 5, and 12 months after the first OMZ injection. At each point, were recorded: pruritus score evaluated using the pruritus visual analog scale (PVAS), bullous pemphigoid disease activity index (BPDAI), including urticaria lesions score, daily cutaneous blisters count, presence and location of MM lesions, eosinophil blood count, and anti-BP180-NC16A IgG and anti-BP180-NC16A IgE levels. The BPDAI values vary between 0 and 360 because of the addition of activity scores between 0 and 120 for each of the following components: cutaneous blisters/erosions, cutaneous urticarial/erythema lesions, and MM lesions. It was used for all patients, including those with MMP instead of the mucous membrane pemphigoid disease activity index (MMPDAI), which does not include a score of activity for cutaneous urticarial lesions.

Total IgE and anti-BP180-NC16A Antibodies Serological Detection

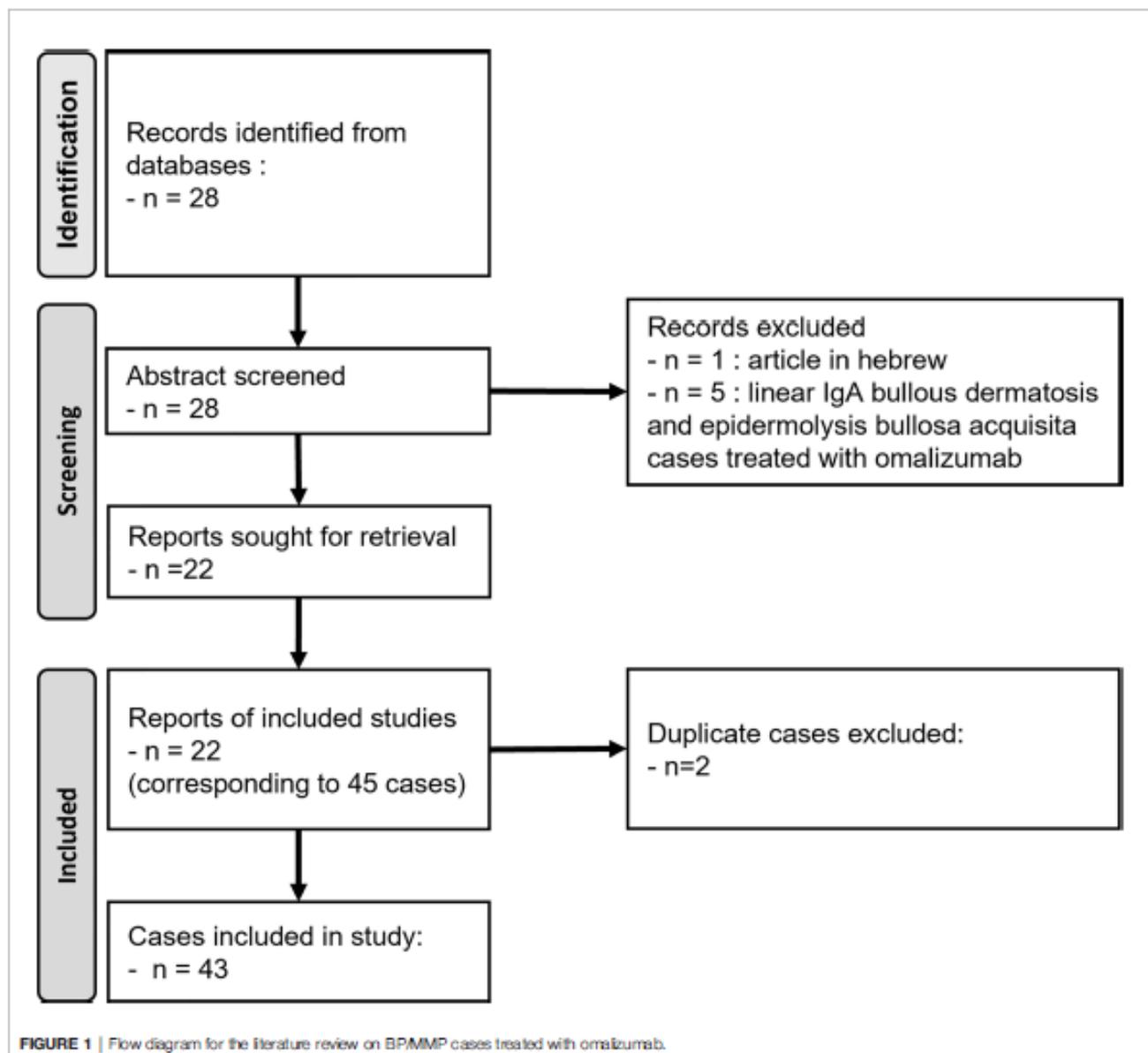
Total serum IgE levels (kIU/L) were determined by ELISA (ImmunoCAP total IgE; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). BP180-NC16A IgG levels were measured using a commercial ELISA kit (MBL Co., Nagoya, Japan). BP180-NC16A IgE levels were determined by an in-house ELISA. This ELISA used microplates coated with the NC16A immunocompetent domain (EUROIMMUN, Bussy-Saint-Martin, France) and was optimized (serial dilutions of the serum and the second antibody). Optimal conditions were obtained with 1:100 diluted sera and HRP-labeled anti-human IgE antibody (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) diluted 1:1000. Antibody levels were determined as mean optical density (OD) values at 450 nm after subtraction of the blank values. Subsequently, the sera of 47 BP, 32 pemphigus, and 33 healthy donors were examined, and a ROC analysis allowed the determination of the cut-off value of 5 relative units (RU)/mL with 70% sensitivity and 100% specificity, according to previous studies (40,41).

Literature Cases

To better discuss our results with those obtained in previously published cases, we performed a literature review of BP and MMP cases treated with OMZ. The research was performed using PubMed and Google Scholar, using the following search terms: "omalizumab", "bullous pemphigoid", "mucous membrane pemphigoid", "autoimmune bullous disease". All reports of BP or MMP treated with OMZ, in English or French, were considered without other eligibility criteria to compare clinical and immunological data of the cases before OMZ therapy and during follow-up. The flow diagram was designed according to the PRISMA guidelines (42) (Figure 1).

Statistics

Quantitative variables are presented as medians and interquartile or extreme values as indicated, or means \pm standard deviation, according to normality, as assessed by the Shapiro test. Qualitative variables are presented as numbers and proportions. Statistical analyses and comparisons between baseline and day 15



were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test using Prism[®] software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Correlations between quantitative variables were assessed using Spearman's test. The Spearman correlation matrix was performed using R Statistical Software (version 2.14.0; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

Study Population at Baseline

Thirteen patients were included, eight women and five men, with a mean age of 66 years (Table 1): 60 years old (range: 37–84) for BP patients and 76 years old (range: 57–90) for MMP patients.

Eight patients had BP and five had MMP. Subepithelial AIBD diagnoses were proven by the presence of immune deposits along the BMZ in DIF in all patients but one, who was already being treated with corticosteroids when addressed in our center. Serological detection by ELISAs and immunoblotting demonstrated autoantibodies against BP180 in 12 patients (92%), BP230 in 7 patients (54%) and 120 kDa $\alpha 6$ integrin in 4 patients (31%). No anti-collagen VII nor laminin 332 reactivity was detected in any patient (Table 1).

Concurrently, total serum IgE levels were above the normal limit of 100 kIU/L in all 13 patients (100%). Eosinophil blood count was above 450 cells/mm³ in 11 of them (84%), and eosinophils infiltrating the dermis on the skin biopsy taken at diagnosis were present in 12 (92%) (Table 1).

TABLE 1 | Patient characteristics at baseline.

Case No.	Sex/Age	Comorbidities	AIBD type	Disease involvement	Skin urticaria/scaling	Histological and immunological results			AIBD duration (months)	Previous therapies	CISA	Total IgE titer (kIU/L)	Eosinophils (cells/mm ³)	Immunoblot IgG (kDa)	
						MM	Eosinophilic skin infiltrate	Deposits along the BMZ in DIF							
1	F/75	HTN, Osteoporosis	BP	Yes/No	No	important	Negative*	np	67/1	180	7	tCS, MMF	No	475	470
2	M/65	HTN, T2DM	BP	Yes/No	No	moderate	Linear IgG, C3	LL	187/65	180 and 120	39	tCS, CS, DDS, MMF	No	9,414	17,000
3	F/67	Spigren's syndrome, Cystadenolymphoma, MGUS, COPD	BP	Yes/No	No	moderate	Linear C3	np	39/41	np	14	tCS, Colchicine DOX	Yes	4,657	450
4	F/59	none	BP	Yes/No	No	moderate	Linear IgG, C3	np	152/200	180 and 120	2	tCS, MTX, DOX	No	1,132	1,060
5	M/62	HTN, depression	BP	Yes/No	No	weak	Linear IgG, C3	LL	129/12	np	1	tCS, DOX	Yes	953	2,490
6	F/50	Asthma, Atopic dermatitis	BP	No/No	No	moderate	Linear IgG, C3	np	11/1	180	118	tCS, MTX, MMF, Csa	No	878	510
7	M/84	T2DM, HTN, Alzheimer's disease	BP	Yes/No	Mouth	important	Linear IgG, C3	np	201/27	180	4	tCS, DOX	No	3,163	2,860
8	F/57	none	BP	Yes/Yes	Mouth	weak	Linear IgG, C3	LL	136/200	180 and 120	1	tCS Colchicine	Yes	964	4,790
9	M/61	HTN, DDS-induced psychosis	MMP	Yes/Yes	Mouth	weak	Linear IgG, C3	np	199/200	np	4	tCS DOX, DDS, RTX	No	4,355	1,560
10	F/57	none	MMP	Yes/Yes	Mouth	No	Linear IgG, C3	np	159/3	180	1	tCS, DDS	No	1,749	5,350
11	F/90	CHD, Breast cancer, chronic hypercalcemia	MMP	Yes/Yes	Pharynx	moderate	Linear IgG, C3	np	73/132	180	5	tCS, DOX	Yes	1,308	1,840
12	F/66	Rheumatoid arthritis	MMP	Yes/Yes	Vulva	moderate	Linear C3	LD	18/1	180 and 120	36	tCS DOX, DDS	Yes	331	230
13	M/85	CHD, cerebral ischemia stroke	MMP	No/No	Mouth	moderate	Linear IgG, IgA, C3	LD	1/1	np	40	CTX, DDS, RTX	Yes	195	200

*Under topical corticosteroids. AIBD, autoimmune bullous disease; BP, bullous pemphigoid; CISA, contraindication to immunosuppressive agent; CHD, chronic ischemic heart disease; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CS, systemic corticosteroids (0.5–1.0 mg/kg/d); Csa, cyclosporin; DDS, dapsone; DIEM, direct immunoelectron microscopy; CTX, cyclophosphamide; DOX, doxycycline; HTN, hypertension; ISA, immunosuppressive agent; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM, mucous membrane pemphigoid; MMP, mycoplasma pneumoniae; MTX, methotrexate; np, not acquired; OML, oral malnutrition; T2DM, type 2 diabetes mellitus; tCS, high potent topical corticosteroids (30–100 µg/d).

Patients had mild ($n = 1$), moderate ($n = 6$), or severe ($n=6$) AIBDs according to BPDAl scoring (mean BPDAl: 56/360), responsible for severe suffering, evolving for a median time of 5.1 months since their diagnosis (range: 0.7–117.8) despite previous treatments; 6 patients had contraindications or had refused other immunosuppressive therapies. All patients had active skin lesions, except for case #13, who had MM involvement only. Case #3 had a prurigo variant of BP, and case #6 had a BP with severe, long-standing pruritus. Seven patients had mucosal lesions involving the buccal, laryngeal, or genital MM (Table 1). At baseline, 12 patients had pruritus with a median PVAS of 7 (range: 4–10), 11 had urticarial lesions with a mean urticarial score of 24.5/120 (range: 0–56), and 10 had daily blisters with a median daily blisters count of 53 (range: 0–580) (Table 2).

Clinical Response After OMZ Adjunction and Outcome

Most patients experienced a rapid improvement within the first days after the initial injection, which resulted in a significant improvement from day 15 in daily blister count, PVAS, and urticarial score (Figures 2, 3).

OMZ quickly achieved disease control in 11 of 13 patients (cases #2–9, #11–13) (85%) at a median time of 30 days (range: 15–90) (Table 2 and Figures 4A–C), which enabled topical CS to be tapered after one month. Complete healing was obtained in these 11 patients and took longer for the 4 patients with laryngeal involvement (cases #9–11, #13) (median: 4 months) than the 3 patients (cases #7, #8, #12) with other MM lesions (median: 1.5 months) (Table 2). CR was achieved in 11 patients at a median time of 3 months (range: 3–7). During a mean follow-up time of 30 months (range: 3–81), none of the patients who achieved CR relapsed, whereas topical CS were weaned in a mean time of 3.8 months \pm 1.6, and despite the delay between OMZ injections tapered or OMZ was weaned in 7 patients (Table 2). At the last follow-up, 4 of these 11 patients (cases #2, #5, #9, #11) (31%) were in CR on minimal therapy despite OMZ weaning for periods of 54, 15, 22, and 3 months, respectively (median: 18.5 months) (Table 2), whereas the 7 other patients (54%) were in CR on therapy with OMZ and minimal therapy dosage for other treatments for a median time of 20 months (range: 0–61).

Failure of add-on therapy with OMZ was observed in 2 patients (cases #1 and #10) (Table 2). OMZ did not induce any improvement and was stopped in case #1, who achieved CR with a high dosage of CS. In case 10, OMZ induced a major initial skin improvement (Figure 2) but was ineffective on MM (Table 2); however, it was continued considering initial benefit and disease severity. CR was subsequently achieved with a combination of rituximab, intravenous immunoglobulins, dapsone, OMZ, and topical CS.

OMZ therapy was administered to all patients for a mean duration of 21 months (range: 3–64). Five patients (38%) experienced adverse events. Two patients experienced mild influenza-like illness immediately after OMZ injections and were easily controlled with paracetamol, which no longer recurred after the 6th injection. Three patients with comorbidities, aged between 84 and 90 years, died (cases #7, #11, and #12) from infectious pneumonia or renal failure (Table 2). These three patients had

received OMZ for 3 to 4 months; two of them (cases #7, and #12) quickly died after having reached CR and were still on OMZ therapy at the time of their death. The third one (case #11) died at 6 months after baseline, 3 months after OMZ weaning.

Biological Results

At baseline, the median eosinophil blood count and total IgE serum levels were 1,590 cells/mm³ (range: 200–17,000) and 1,132 kIU/L (range: 195–9,414), respectively. Anti-BP180 IgG level was above the normal range of 9 RU/mL in 12 patients, with a mean value of 106 RU/mL (range: 6–201). The specific anti-BP180 IgE level was above the positive cut-off value of 5 RU/mL in eight patients, with a median value of 27 RU/mL (range: 12–761). Interestingly, anti-BP180 IgE were not found in the two patients who had therapeutic failure with OMZ (cases #1 and #10) and in the three patients with the lowest levels of anti-BP180 IgG (cases #6, #12, and #13).

Biological follow-up demonstrated a rapid decrease in eosinophil blood count within the first month of OMZ therapy and returned to normal on day 150 (Figure 4D). After 1 year of follow-up, the mean anti-BP180 IgG titer was 23 RU/mL (range: 5–63 RU/mL). Among the 12 initially positive cases for anti-BP180 IgG, all had a progressive decrease that began within 2 months and became undetectable in 3 of them at 1-year follow-up, except for cases #1 and #10, which failed to reach disease control with OMZ and demonstrated a rebound in line with clinical activity (Figure 4E). Finally, the specific anti-BP 180 IgE level decreased in six of the eight positive cases at baseline and negated for one patient (case #5); cases #3 and #7 remained at the same level at the last follow-up despite a decrease in anti-BP180 IgG and CR on OMZ therapy (Figure 4F). Overall, these variables showed a parallel, gradually decreasing evolution towards negatation or normal levels on average (Figure 4G).

At baseline, clinical variables reflecting disease activity (BPDAl, urticarial score, daily blister count) were significantly positively correlated with immunological variables (eosinophil count, total serum IgE, anti-BP180 IgE and IgG) (Figure 5). Only the positive correlations between the daily blister count at baseline and total serum IgE or anti-BP 180 IgE were not found to be significant. AIBD duration before OMZ therapy was negatively correlated with the clinical and immunological variables. No significant correlation was found between pruritus score (data not shown) or the time to achieve disease control (data not shown) or CR and other variables. Immunological variables were significantly positively correlated with each other, except for a positive correlation between eosinophil blood count and specific anti-BP180 IgE levels (Figure 5).

Literature Review

The literature review identified 45 cases, of which 43 were included in our analysis (Additional Table 1), of which 21 were published as case series and 22 as case reports. Patients (mean age: 66.9 years \pm 17.9) had treatment-resistant BP to one or several therapies, with seven cases having non-predominant MM involvement (16–18, 31). The BPDAl score was available only in a series of six patients from De et al, with a mean BPDAl score of 41 (29). Hypereosinophilia was reported in 60% of cases (median: 1,200 cells/mm³, range: 100–17,700). An elevated total

TABLE 2 | Outcomes of OMZ therapy.

Case No	OMZ regimen	Concurrent therapies with OMZ	Duration of concurrent therapies before OMZ (months)	Baseline BPDAI score	PVAS		Daily blisters count		Urticarial lesions		MM lesions		Time to		Last follow-up
					Baseline (score)	Time to normalize (days)	Baseline (number)	Time to normalize (days)	Baseline (score)	Time to normalize (days)	Time to normalize (days)	DC/CR (days)	OMZ tapering/weaning (months)	Time since baseline/since CR (months)	
1	450 mg Q2 wk	CS,MMF 1.5 g/d	10.3,3.1	28	6	20	na	7	failure	NA	NA	No/No	no/7	55/42	CR on minimal therapy (CS)
2	600 mg Q2 wk	CS,DDS 100 mg/d MMF 3 g/d	13.4,13.4,0.8	73	8	400	15	41	30	NA	NA	1/4	5/27	81/78	CR on minimal therapy (MMF, DDS)
3	600 mg Q2 wk	CS	3.7	21	7	0	na	9	15	NA	NA	1/3	5/no	38/33	CR on OMZ CS wks
4	600 mg Q2 wk	CS,DOX 200 mg/d	3.7,3.7,1.1	53	10	100	30	21	30	NA	NA	1/4	15/no	23/20	CR on OMZ CS wks and minimal therapy (MTX)
5	300 mg Q4 wk	CS,DOX 200 mg/d	0.4,0.4	47	10	71	15	22	30	NA	NA	1/6	15/18	33/30	CR on minimal therapy (MTX, psoriasis) instituted at M15 for
6	300 mg Q2 wk	CS,MMF 2 g/d	10.3,4.1	16	10	0	na	0	na	NA	NA	1/4	7/no	64/61	CR on OMZ CS wks and minimal therapy (MMF)
7	600 mg Q2 wk	CS,DOX 200 mg/d	2.8,2.5	68	5	168	30	35	15	Mouth: 30	Mouth: 30	1/2	no/no	3/NA	CR on OMZ CS wks. Death from aspiration pneumonia at M3
8	450 mg Q2 wk	CS,DOX 200 mg/d	0.8,0.8	96	5	53	15	56	60	Mouth: 60	Mouth: 60	1/6	3/no	10/6	CR on OMZ CS wks and minimal therapy (DOX)
9	600 mg Q2 wk	CS,DOX 200 mg/d RTX 2 g*	6.2,3.5,1.6	71	6	43	60	32	90	Mouth: 30 Larynx: 150	Mouth: 30 Larynx: 150	1/5	5/12	34/27	CR on minimal therapy (DOX)
10	600 mg Q2 wk	CS,DDS 125 mg/d RTX 2g (M)	0.3,0.3,1	131	9	580	150	53	30	failure	failure	5/no	no/no	28/21	CR on OMZ 600 mg Q2 wks, tCS 30 g/w, DDS 50 mg/d, IMG 2g Q3 wks, RTX (2 g at M1, M2 and M18)
11	600 mg Q2 wk	CS,DDS 100 mg/d	2.4,1.0	98	4	75	15	30	15	Mouth: 60 Larynx: 120	Mouth: 60 Larynx: 120	1/2	no/3	6/2	CR on DDS. Death from kidney failure at M6
12	450 mg Q4 wk	CS,DDS 25 mg/d	1.6,1.2	21	7	5	60	3	60	Vulva: 60	Vulva: 60	na/2	no/no	4/NA	CR on OMZ. Death from COVID-19 pneumonia at M4
13	300 mg Q4 wk	DDS 75 mg/d	32.5	5	0	0	na	na	na	Gentat: 60 Mouth: 90 Larynx: 120	Gentat: 60 Mouth: 90 Larynx: 120	na/na	no/no	40/34	CR on OMZ 300 mg Q4 wks and minimal therapy (DDS)

*Previously programmed a second RTX cycle for consolidation at M4 from baseline; † Rituximab was introduced 3 months after OMZ. BPDAI, bullous pemphigoid disease area index; CR, complete remission; DC, disease control; DDS, dapsone; DOX, doxycycline; MMF, mycophenolate mofetil; M1/M12: 1 or 12 months from baseline; MTX, methotrexate; na, not acquired; OMZ, omalizumab; PVAS, pruritus visual analog scale; tCS, high potent topical corticosteroids (30–40 g/d); Q2 wks, every 2 weeks.

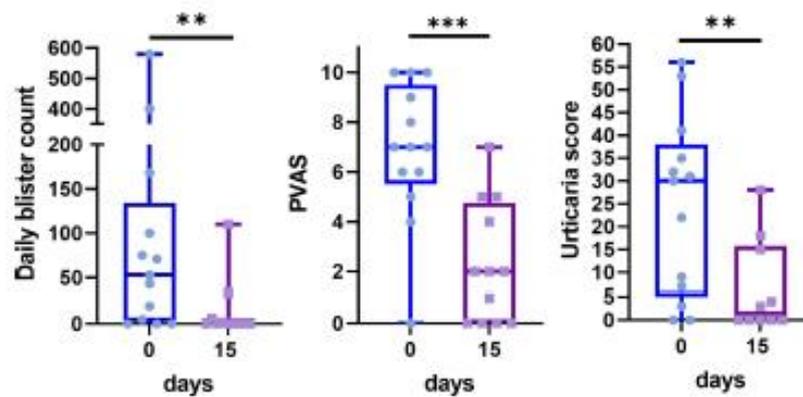


FIGURE 2 | Dramatic improvement of daily blister count, pruritus visual analog score (PVAS) and urticaria score between baseline (blue) and the 15th day after omalizumab therapy (purple). Data are presented as box and whisker plots showing extreme values, interquartile ranges, and medians. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Wilcoxon signed-rank test).



FIGURE 3 | Clinical improvement during omalizumab therapy. Case #2 at baseline (A) and day 15 (B); case #9 at baseline (C) and day 30 (D); case #11 at baseline (E) and day 30 (F).

IgE titer was observed in 74% of cases (median: 1,569 kIU/L; range: 73–22,682 kIU/L). Subcutaneous OMZ was administered at a dose of 300 mg (81%), with an initial injection interval of 2–6 weeks. Most patients (86%) received OMZ in combination with concomitant immunosuppressive therapies, including systemic CS (79%), high potent topical CS (35%), and azathioprine (14%).

Short-term results within the first month were available in only 16 patients (37%), of whom 87% demonstrated a quick improvement and achieved partial improvement (50%) or disease control (37%). Middle-term results, between the second and the fourth month after OMZ, demonstrated that 26 patients achieved disease control (60%), with CR on OMZ (53%), or CR off after a single OMZ injection in 2 patients. The specific outcomes of MM lesions have not been described. Adverse

events were noted in 12% of cases; however, their direct relationship with OMZ therapy was not clear.

At the last follow-up, CR was not achieved in 11 cases (25%), with only partial improvement (16%) or therapeutic failure (7%). The best outcome achieved during follow-up was a CR in 32 cases (74%), with a 6-month median time for CR (range: 2–42 months). Disease control allowed concomitant therapies to be tapered or weaned in most of these patients. OMZ was discontinued in seven patients, resulting in a 71% relapse rate, whereas only one relapse was reported on OMZ continuation. Immunological follow-up data were sparse in most cases, showing normalization of eosinophilia and a decrease in total IgE and anti-BP180 IgG. Quantitative (ELISA) or qualitative (immunoblot) measurement of specific anti-BP180 IgE was carried out in only 2 and 7 cases, respectively (10, 11, 29) and

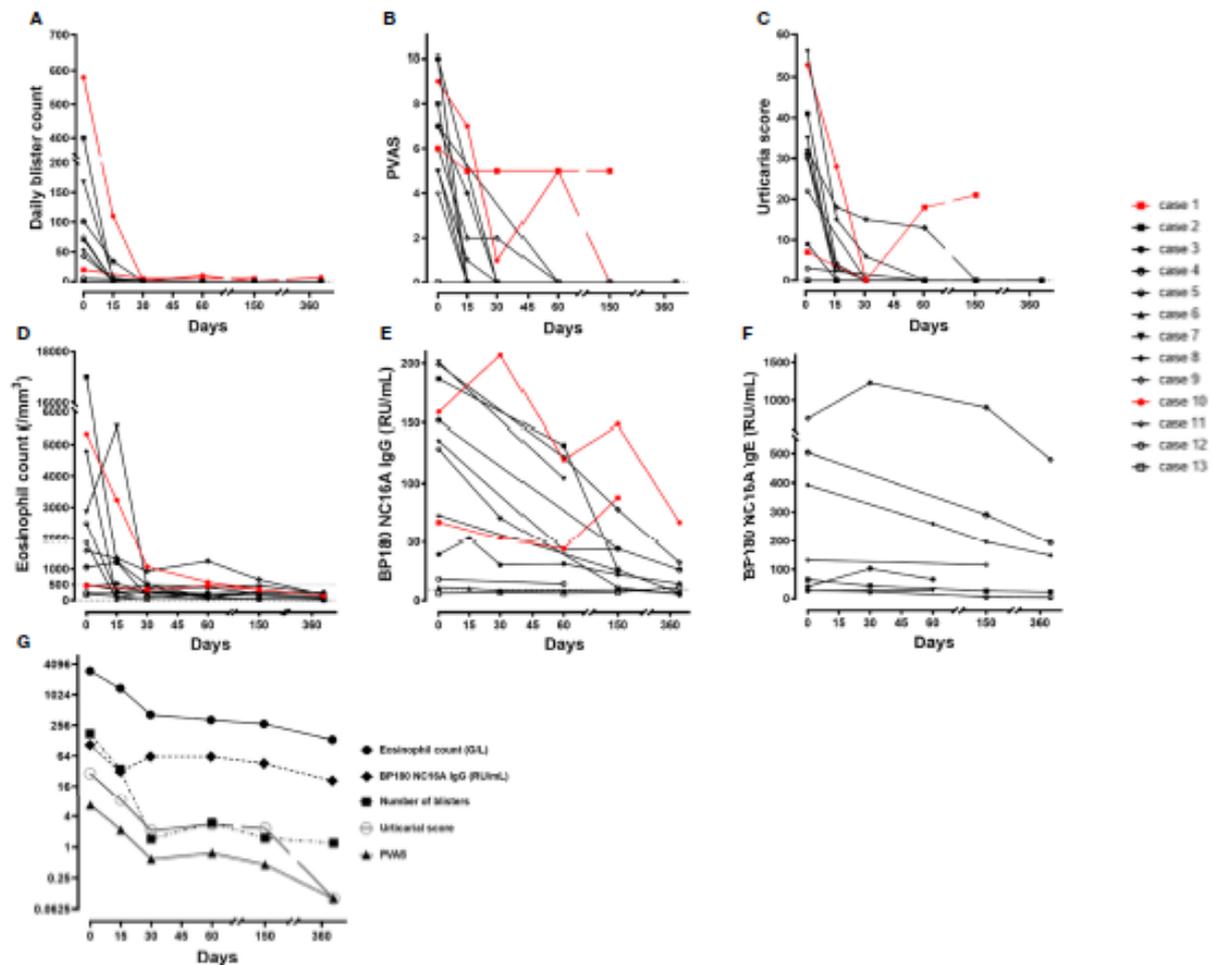


FIGURE 4 | Clinical and laboratory variables during the first year after omalizumab therapy in the 13 patients. Individual values through time on a linear scale (black: remittent patients, red: non-remittent patients): **(A)** Daily blister count, **(B)** Pruritus visual analogic score, **(C)** Urticaria score, **(D)** Eosinophil count, **(E)** BP180-NC16A IgG level, **(F)** BP180-NC16A IgE level over time for the 8 patients with measurable IgE auto-antibodies during follow-up, **(G)** Log₂ scale evolution of the mean values over time of eosinophil blood count, daily blister count, pruritus visual analogic score, and BP180-NC16A IgG.

were positive in 4 patients, of whom one had negatvation at 3-month follow-up (29).

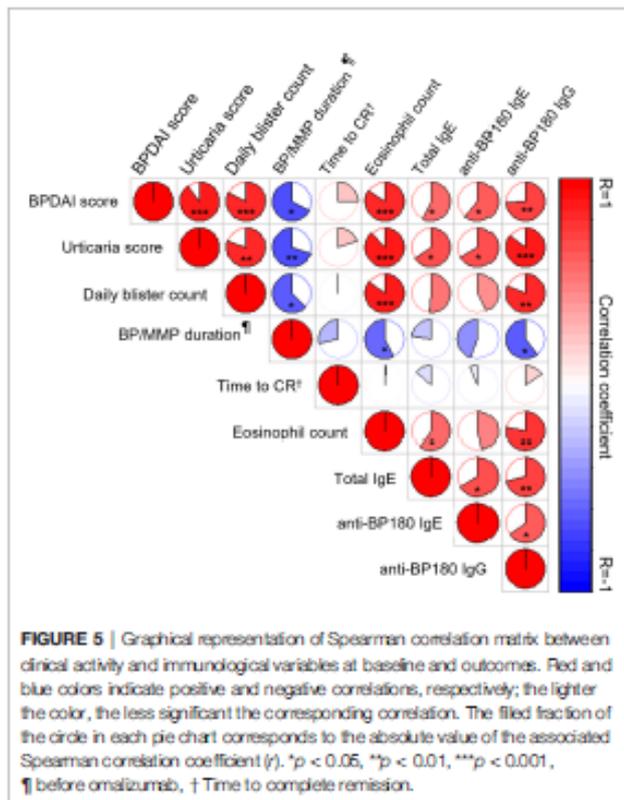
DISCUSSION

AIBD management can be difficult, especially in treatment-resistant cases requiring rapid relief of pruritus, blisters, and erosions. The role of IgE autoantibodies has been demonstrated in BP in recent years, which led to the off-label use of OMZ, a humanized monoclonal anti-IgE antibody depleting total serum IgE, in refractory BP patients. Here, we report the largest retrospective series of AIBDs treated with OMZ, involving 13 patients with precise short- and long-term clinical and immunological outcomes, and compare these results with the data of 43 BP cases in the literature. Our study has obvious

limitations, including a small sample size and monocentric recruitment. Nevertheless, our case series with detailed follow-up and homogenous therapeutic management strengthens the previous data on OMZ efficacy in first-line therapy-resistant BP and highlights the efficacy of OMZ in MM lesions, notably in MMP patients, which was not previously reported.

Clinical and Immunological Data at Baseline

Our series included 13 first-line treatment-refractory patients, 8 with BP and 5 with MMP, with a 66-year-old mean age. The subgroup of patients with BP was young (mean age: 60 years) in comparison with the mean age of BP patients older than 80 years in a large French cohort (43). Overall, our patients had moderate to severe disease according to the cut-off values of the BPDAl score defining the severity categories in BP (44), with a higher



median BPDAl score than the cohort used to elaborate these cut-off values (53 and 37.5, respectively). In addition, our patients experienced severe pruritus with a mean PVAS of 7/10, whereas a recent series investigating pruritus and quality of life in BP described a mean pruritus intensity of 5.2/10 and showed that patients with a score above 5 had a greater alteration in their quality of life (45). As expected, our series included patients positive for anti-BP180 IgG (92%). IgE levels and eosinophil blood count were not decision criteria as such to start OMZ. Nevertheless, 100% of our patients had elevated total serum IgE, and 84% had elevated eosinophil blood count. We found elevated specific anti-BP180 IgE in eight patients, including six out of eight BP patients (75%) and in two out of five patients with MMP (40%).

In comparison with the previously published BP cases treated with OMZ, our series included patients of similar age, with a higher proportion of patients with MM involvement considering the inclusion of patients with MMP, notably 3 with laryngeal involvement. Most literature cases lacked BPDAl score and pruritus severity evaluation. Nevertheless, the mean BPDAl score in our series was similar to that reported by De et al., with a mean BPDAl score higher than 50 (29). The rates of cases with elevated total serum IgE and eosinophil blood count were slightly higher in our study. With our in-house anti-BP180 IgE ELISA, we were the first to demonstrate specific anti-BP180 IgE levels in MMP patients at baseline. The rate of anti-BP180 IgE in BP patients (75%) found in our series with an in-house ELISA was higher than in the study of De et al. who reported anti-BP180

IgE in 2 of 6 patients' sera tested with an immunoblotting technique (29). A decrease in anti-BP180 IgE after OMZ therapy was reported in 6 out of 8 patients in our study, whereas an increase in optical density at 3 months in one patient has been reported in the only quantitative assessment after OMZ available in the literature (19). The rate of anti-BP180 IgE negativation at last follow-up was low (1 out of 8 patients) in our series, whereas only one patient negated immunoblot reactivity from the 2 positive ones at baseline in the series from De et al. (29).

Similar to most studies investigating this issue in BP (2), we found significant positive correlations between disease severity in BP/MMP and immunological variables at baseline (circulating eosinophils, total serum IgE levels, anti-BP180 IgE and IgG levels). Circulating anti-BP180 IgG was significantly correlated with urticaria and blistering. While specific anti-BP-180 IgE was inconsistently associated with clinical phenotype (e.g., urticarial or nodular) in previous studies (2), specific anti-BP180 IgE levels were significantly correlated only with the urticaria score in our series. Moreover, we found that anti-BP180 IgG and specific IgE levels were positively correlated at baseline. Interestingly, only two patients with elevated levels of anti-BP180 IgG but absence of anti-BP180 IgE were both OMZ therapeutic failures (see below).

Clinical Response to Omalizumab

In our series, OMZ significantly reduced clinical symptoms (pruritus, urticaria, and blisters) from day 15, and disease control was achieved in a median time of 30 days. Furthermore, we reported for the first time OMZ efficacy on MM involvement, with six patients (86%) having experienced complete re-epithelialization. The latter was obtained in a shorter time for buccal and vulvar involvement than for laryngeal lesions. At the last follow-up, an 85% CR rate and a 15% therapeutic failure rate were observed. The 3-month median time to achieve CR was short, considering that these patients were resistant to previous treatments and that 7 cases had MM involvement. Indeed, two BP cases in our series had mucosal lesions that responded more slowly to conventional therapy (46). In addition, five patients had MMP, whereas the time to obtain CR with intravenous immunoglobulins or rituximab in MMP without ocular involvement was estimated at 22 and 5 months, respectively, in a recent review. Complete resolution was obtained in 77.8% and 50.0% of patients, respectively, with intravenous immunoglobulins and rituximab (47). Moreover, as naso-pharyngo-laryngeal endoscopy is an invasive procedure, it was not repeated before day 60, then day 120; thus, the time to achieve CR might have been overestimated in our three patients with laryngeal involvement. Lastly, 54% of patients achieved CR on minimal therapy with OMZ continuation and 31% CR on minimal therapy after OMZ weaning without any relapse, with a median follow-up time of 18.5 months in these latter.

Overall, our results reinforce the evidence for the rapid effectiveness of OMZ, as already outlined in the literature. Our series specified information highlighting its rapid improvement through systematic monitoring; notably the striking decrease of clinical symptoms at day-15, a one-month median time to

achieve disease control and a 3-month median time to reach complete remission. At the last follow-up, an 85% CR rate and a 15% therapeutic failure rate were observed, which were slightly better than the outcomes from the literature review we performed, which demonstrated 74% and 25% rates, respectively. A third of our patients achieved CR on minimal therapy after OMZ weaning, without relapse, while a high relapse rate after OMZ withdrawal was reported in the literature. This difference might be explained by a slower decrease in therapies that only began after disease control. Notably, topical CS was slowly tapered over 4 months, according to the French guidelines for the therapeutic management of BP (48). OMZ tapering was initiated only after CS weaning in all patients with CR. Indeed, as in other indications, such as urticaria, the modalities of tapering and weaning for OMZ need to be clarified. In fact, as in the literature, a majority of patients still continued OMZ at the last follow-up for long periods, which allowed concomitant therapies cessation or tapering to their minimal dosage to prevent relapse. This continuation for long periods might represent the greatest barrier to the widespread use of OMZ considering its cost.

The target population for OMZ in patients with AIBD would also need to be clarified, but as our group size was small, with a large majority of patients responsive to OMZ therapy, we could not ascertain predictive factors of response to OMZ. No variable tested in the correlation matrix reached statistical significance with the time to achieve disease control or complete remission. Thus, as previously described by Lonowski et al. (23), we cannot conclude that patient selection for OMZ therapy should hinge upon the level of urticaria lesions, eosinophil count, or total serum IgE. Nevertheless, only two patients with very high levels of anti-BP180 IgG but no anti-BP180 IgE had therapeutic failure with OMZ. Thus, this immunological combination might constitute a negative predictive factor for the response to OMZ. This association has not previously been described in the literature but only a very few studies (10, 11, 19, 29) investigated anti-BP180 IgE, and most of them performed immunoblot analysis rather than anti-BP180 IgE ELISA. Lastly, only one case reported by Dufour et al. demonstrated elevated anti-BP180 IgG titers in ELISA without IgE in immunoblot (11), and one case from the series of De et al. showed anti-BP180 IgG positivity and anti-BP180 IgE negativity in immunoblotting (29). In these cases, OMZ allowed a significant improvement or a complete response.

Our series is the first to report the results of OMZ therapy in MM involvement, especially in patients with MMP diagnoses confirmed on DIEM. OMZ was found to be rapidly effective to decrease skin symptoms in all MMP patients who had skin involvement at baseline. OMZ as add-on therapy allowed a CR in four of the five MMP patients, notably in patient #13 having only MM involvement with normal eosinophil blood count and a moderate elevation of total IgE. After a striking improvement, patient #10 was classified as a failure because the disease relapsed and required additional therapies with OMZ continuation.

Omalizumab Tolerance - Adverse Events

The good tolerance profile of OMZ is well documented in asthma and chronic urticaria, even in patients older than 65 years (49, 50),

notably in comparison with other immunosuppressive therapies (42). Adverse events were observed in 5 patients (38%) in our series, which was higher than the adverse event rate reported in the literature (12%). This difference was not related to a longer follow-up duration, as all adverse events occurred within the first 6 months of OMZ therapy. Two patients experienced grade 2 drug-related adverse events (influenza illness reactions). Three grade 5 adverse events (two pneumonias and one renal failure) led to death in three very fragile and old patients with significant comorbidities, without apparent direct relationship between OMZ therapy and death, even more as OMZ was stopped 5 months before death in one of these three patients.

Immunological Monitoring After Omalizumab

For the first time, we provided the time-course of immunological variables in AIBD patients under OMZ throughout the follow up over one year. As previously described in BP (51), the eosinophil blood count and anti-BP180 IgG level seemed to follow the course of clinical variables. Notably, the eosinophil blood count showed a dramatic decrease within the first month, mirroring the rapid decrease in urticaria and pruritus. The decrease in anti-BP180 IgG level was slower and progressive over the one-year follow-up for BP patients but also for MMP patients positive at baseline; most of them still demonstrated positive levels of anti-BP-180 IgG at one-year follow-up which was already described in BP patients with other therapies such as B-cell depletion therapy with rituximab (52). A similar slow decrease was observed for anti-BP180 IgE in patients with high anti-BP180 IgE levels at baseline, whereas other patients in CR had stable levels despite OMZ. As previously hypothesized for anti-BP180 IgG (53), our results suggest the need for maintenance therapy to prevent relapses in the absence of rapid or complete clearance of anti-BP180 IgE under OMZ. This could also explain the high rates of patients still on OMZ or off OMZ with minimal dosage of concomitant therapies at the end of follow-up in our series.

In conclusion, add-on therapy with OMZ allowed BP patients and MMP patients in situations of therapeutic impasse to pass a milestone, achieving fast improvement within the first 2 weeks, disease control at 1 month and a 85% rate of CR. Our results and those from the literature should be confirmed by larger retrospective and controlled studies, which might more accurately precise OMZ efficacy in late observation endpoints, such as CR on minimal therapy, and better identify the predictive factors of therapeutic response. Considering predictive factors, our results point to the need to pay particular attention to patients with a dissociation between a high anti-BP180-NC16A IgG level and the absence of specific anti-BP180-NC16A IgE levels. Although OMZ was found to be safe in large studies for other indications, future studies should confirm this good safety profile in the elderly, as we reported apparently non-OMZ-related deaths in three old patients. Finally, in patients with refractory BP and MMP, OMZ is an effective option to control their diseases and to stop or decrease concomitant immunosuppressive therapies to their minimal effective dose.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité Local d'Éthique pour la Recherche Clinique des HUPSSD Avicenne-Jean Verdier-René Muret (CLEA #2020-140). Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MA, GB, and CPS contributed to the conception and design of the study. MA, GB, CL, IS, FC, and CPS participated in patients' daily care and data collection. FM and SGM performed the

immunological and biological analyses. MA and GB reviewed the charts and organized the databases. GB and TG performed statistical analyses and figure preparation. MA wrote the first draft of this manuscript. GB and SGM wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Benoit Mellotée, Laurie Rousset (MD), and Tannvir Desroche (MD) for their participation in the daily care of patients with autoimmune bullous diseases, without whom this work could not have been done. We thank Jérôme Biton (PhD, UMR INSERM 1125 Li2P, Bobigny, France) for his help in producing the correlation matrix.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.874108/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid Diseases. *Lancet* (2013) 381:320. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61140-4
- Amber KT, Maglie R, Solimani F, Eming R, Hertl M. Targeted Therapies for Autoimmune Bullous Diseases: Current Status. *Drugs* (2018) 78:1527-48. doi: 10.1007/s00403-018-0976-5
- Sariklidou AH, Tighe PJ, Fairclough LC, Todd I. IgE Autoantibodies and Their Association With the Disease Activity and Phenotype in Bullous Pemphigoid: A Systematic Review. *Arch Dermatol Res* (2018) 310:11-28. doi: 10.1007/s00403-017-1789-1
- Messingham KN, Crowe TP, Fairley JA. The Intersection of IgE Autoantibodies and Eosinophilia in the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid. *Front Immunol* (2019) 10:2331. doi: 10.3389/fimmu.2019.02331
- Yayli S, Pelivani N, Beltraminelli H, Wirthmüller U, Belzenay Z, Horn M, et al. Detection of Linear IgE Deposits in Bullous Pemphigoid and Mucous Membrane Pemphigoid: A Useful Clue for Diagnosis. *Br J Dermatol* (2011) 165:1133-7. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10481.x
- Christophoridis S, Büdinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Hertl M. IgG, IgA and IgE Autoantibodies Against the Ectodomain of BP180 in Patients With Bullous and Cicatricial Pemphigoid and Linear IgA Bullous Dermatitis. *Br J Dermatol* (2000) 143:349-55. doi: 10.1046/j.1365-2133.2000.03661.x
- Adachi M, Kozawa M, Yoshisue H, Lee Milligan K, Nagasaki M, Sasajima T, et al. Real-World Safety and Efficacy of Omalizumab in Patients With Severe Allergic Asthma: A Long-Term Post-Marketing Study in Japan. *Respir Med* (2018) 141:56-63. doi: 10.1016/j.rmed.2018.06.021
- Jia H-X, He Y-L. Efficacy and Safety of Omalizumab for Chronic Spontaneous Urticaria: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Therap* (2020) 27:e455-77. doi: 10.1097/MJT.0000000000000912
- Metz M, Staibach P, Bauer A, Brehler R, Gericke J, Kangas M, et al. Clinical Efficacy of Omalizumab in Chronic Spontaneous Urticaria Is Associated With a Reduction of FcεR1-Positive Cells in the Skin. *Theranostics* (2017) 7:1266-76. doi: 10.7150/thno.18304
- Fairley JA, Baum CL, Brandt DS, Messingham KAN. Pathogenicity of IgE in Autoimmunity: Successful Treatment of Bullous Pemphigoid With Omalizumab. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 123:704-5. doi: 10.1016/j.jaci.2008.11.035
- Dufour C, Souillet AL, Chaneliere C, Jouen F, Bodemer C, Julien D, et al. Successful Management of Severe Infant Bullous Pemphigoid With Omalizumab. *Br J Dermatol* (2012) 166:1140-2. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.110748.x
- London VA, Kim GH, Fairley JA, Woodley DT. Successful Treatment of Bullous Pemphigoid With Omalizumab. *Arch Dermatol* (2012) 148:1241-3. doi: 10.1001/archdermatol.2012.1604
- Yalcin AD, Genc GE, Celik B, Gumushu S. Anti-IgE Monoclonal Antibody (Omalizumab) Is Effective in Treating Bullous Pemphigoid and Its Effects on Soluble CD200. *Clin Lab* (2014) 60:523-4. doi: 10.7754/Clin.Lab.2013.130642
- Yu KK, Crew AB, Messingham KAN, Fairley JA, Woodley DT. Omalizumab Therapy for Bullous Pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* (2014) 71:468-74. doi: 10.1016/j.jaad.2014.04.053
- Balakirski G, Alkhatieb A, Merk HF, Leverkus M, Megahed M. Successful Treatment of Bullous Pemphigoid With Omalizumab as Corticosteroid-Sparing Agent Report of Two Cases and Review of Literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2016) 30:1778-82. doi: 10.1111/jdv.13758
- Gönlü M, Keseroglu H, Ergin C, Özcan I, Erdem Ö. Bullous Pemphigoid Successfully Treated with Omalizumab. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* (2016) 82:577-9. doi: 10.4103/0378-6323.183628
- Bilgiç Temel A, Bassorgun CI, Akman-Karakaş A, Alpsoy E, Uzun S. Successful Treatment of a Bullous Pemphigoid Patient With Rituximab Who Was Refractory to Corticosteroid and Omalizumab Treatments. *Case Rep Dermatol* (2017) 9:38-44. doi: 10.1159/000452828
- İncel Uysal P, Yalçın B, Ayye Ö. [Our Clinical Experience With the Use of Omalizumab in the Treatment of Bullous Pemphigoid]. *Turkderm-Türk Arch Dermatol Venereol* (2017) 51:124-8. doi: 10.4274/turkderm.65983
- Menzinger S, Kaya G, Schmidt E, Fontao I, Iaffite E. Biological and Clinical Response to Omalizumab in a Patient With Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol* (2018) 98:284-6. doi: 10.2340/00015555-2845
- Ewy S, Pham H, Quan K, Su B, Tachdjian R. Successful Omalizumab Therapy for Bullous Pemphigoid Despite Transient Reaction. *J Drugs Dermatol* (2019) 18:947-9.
- James T, Salman S, Stevenson B, Bundell C, Kelly G, Nolan D, et al. IgE Blockade in Autoimmunity: Omalizumab Induced Remission of Bullous Pemphigoid. *Clin Immunol* (2019) 198:54-6. doi: 10.1016/j.clim.2018.12.015

22. Maglie R, Antiga E, Quintarelli L, Verdelli A, Caproni M. Dramatic Exacerbation of Bullous Pemphigoid Following Rituximab and Successful Treatment With Omalizumab. *Eur J Dermatol* (2019) 29:213–5. doi: 10.1684/ejd.2019.3499
23. Seyed Jafari SM, Gadaldi K, Feldmeyer L, Yaswalkar N, Borradori L, Schlapbach C. Effects of Omalizumab on Fcεr1 and IgE Expression in Lesional Skin of Bullous Pemphigoid. *Front Immunol* (2019) 10:1919. doi: 10.3389/fimmu.2019.01919
24. Vico-Alonso C, Calleja-Algarra A, Aragon-Miguel R, Sanchez-Velazquez A, Velasco-Tamariz V, Ortiz-Romero PL, et al. Omalizumab as an Alternative Therapeutic Tool in the Treatment of Bullous Pemphigoid: A Case Report. *Dermatol Ther* (2019) 32:e12829. doi: 10.1111/dth.12829
25. Garrido PM, Alexandre MI, Travassos AR, Filipe P. Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibitor-Associated Bullous Pemphigoid Efficiently Treated With Omalizumab. *Dermatol Ther* (2020) 33:e14160. doi: 10.1111/dth.14160
26. Lonowski S, Sachman S, Patel N, Truong A, Holland V. Increasing Evidence for Omalizumab in the Treatment of Bullous Pemphigoid. *JAAD Case Rep* (2020) 6:228–33. doi: 10.1016/j.jidcr.2020.01.002
27. Navarro-Triviño FJ, Llamas-Molina JM, Ayen-Rodríguez A, Cancela-Díez B, Ruiz-Villaverde R. Dramatic Improvement of Bullous Pemphigoid With Omalizumab in an Elderly Patient. *Eur J Hosp Pharm* (2020) 2020:2418. doi: 10.1136/ejhp-2020-002418
28. Sinha S, Agrawal D, Sardana K, Kulhari A, Malhotra P. Complete Remission in a Patient With Treatment Refractory Bullous Pemphigoid After a Single Dose of Omalizumab. *Indian Dermatol Online J* (2020) 11:607–11. doi: 10.4103/idoj.IDOJ_438_19
29. De D, Kaushik A, Handa S, Mahajan R, Schmidt E. Omalizumab: An Underutilized Treatment Option in Bullous Pemphigoid Patients With Co-Morbidities. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2021) 35:e469–72. doi: 10.1111/jdv.17229
30. Margin M-A, Lienhart A, Gouraud A, Roux S, Hodique F, Jouen F, et al. Onset of Acquired Haemophilia A After Omalizumab Treatment in Severe Bullous Pemphigoid – a Report on Two Cases Successfully Treated With Mycophenolate Mofetil. *Ann Dermatol Venereol* (2021) 148:57–9. doi: 10.1016/j.annder.2020.09.577
31. Sarrazin M, Jouen F, Duvert-Lehembre S. Refractory Bullous Pemphigoid With IgE Anti-BP230 and IgG Anti-P200 Antibodies Successfully Treated With Omalizumab. *Ann Dermatol Venereol* (2021) 148:60–2. doi: 10.1016/j.annder.2020.08.053
32. Seyed Jafari SM, Feldmeyer L, Bosart S, Simon D, Schlapbach C, Borradori L. Case Report: Combination of Omalizumab and Dupilumab for Recalcitrant Bullous Pemphigoid. *Front Immunol* (2021) 11:611549. doi: 10.3389/fimmu.2020.611549
33. Kremer N, Snaat I, Cohen ES, Hodak E, Mimouni D, Lapidot M, et al. Rituximab and Omalizumab for the Treatment of Bullous Pemphigoid: A Systematic Review of the Literature. *Am J Clin Dermatol* (2019) 20:209–16. doi: 10.1007/s40257-018-0401-6
34. Gaudin O, Seta V, Alexandre M, Bohelay G, Aucouturier F, Mignot-Grootenboer S, et al. Gliptin Accountability in Mucous Membrane Pemphigoid Induction in 24 Out of 313 Patients. *Front Immunol* (2018) 9:1030. doi: 10.3389/fimmu.2018.01030
35. Grootenboer-Mignot S, Descamps V, Picard-Dahan C, Nicaise-Roland P, Prost-Squarcioni C, Leroux-Villet C, et al. Place of Human Amniotic Membrane Immunoblotting in the Diagnosis of Autoimmune Bullous Dermatoses. *Br J Dermatol* (2010) 162:743–50. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09566.x
36. Vaillant L, Bernard P, Joly P, Prost C, Labaille B, Bedane C, et al. Evaluation of Clinical Criteria for Diagnosis of Bullous Pemphigoid. French Bullous Study Group. *Arch Dermatol* (1998) 134:1075–80. doi: 10.1001/archderm.134.9.1075
37. Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, et al. The First International Consensus on Mucous Membrane Pemphigoid: Definition, Diagnostic Criteria, Pathogenic Factors, Medical Treatment, and Prognostic Indicators. *Arch Dermatol* (2002) 138:370–9. doi: 10.1001/archderm.138.3.370
38. Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, et al. Definitions and Outcome Measures for Bullous Pemphigoid: Recommendations by an International Panel of Experts. *J Am Acad Dermatol* (2012) 66:479–85. doi: 10.1016/j.jaad.2011.06.032
39. Murrell DF, Marinovic B, Caux F, Prost C, Ahmed R, Wozniak K, et al. Definitions and Outcome Measures for Mucous Membrane Pemphigoid: Recommendations of an International Panel of Experts. *J Am Acad Dermatol* (2015) 72:168–74. doi: 10.1016/j.jaad.2014.08.024
40. Hashimoto T, Ohzono A, Teye K, Numata S, Hiroyasu S, Tsuruta D, et al. Detection of IgE Autoantibodies to BP180 and BP230 and Their Relationship to Clinical Features in Bullous Pemphigoid. *Br J Dermatol* (2017) 177:141. doi: 10.1111/bjd.15114
41. van Beek N, Lüttmann N, Huebner F, Recke A, Karl I, Schulze FS, et al. Correlation of Serum Levels of IgE Autoantibodies Against BP180 With Bullous Pemphigoid Disease Activity. *JAMA Dermatol* (2017) 153:30–8. doi: 10.1001/jamadermatol.2016.3357
42. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* (2021) 372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71
43. Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bedane C, Duvert-Lehembre S, et al. Incidence and Mortality of Bullous Pemphigoid in France. *J Invest Dermatol* (2012) 132:1998–2004. doi: 10.1038/jid.2012.35
44. Masmoudi W, Vaillant M, Vasileva S, Patsatsi A, Quereux G, Moltrasio C, et al. International Validation of the Bullous Pemphigoid Disease Area Index Retrospective Score and Calculation of Cut-Off Values for Defining Mild, Moderate and Severe Types of Bullous Pemphigoid. *Br J Dermatol* (2021) 184:1106–12. doi: 10.1111/bjd.19611
45. Briand C, Gourier G, Poizeau F, Jelti L, Bachelerie M, Quereux G, et al. Characteristics of Pruritus in Bullous Pemphigoid and Impact on Quality of Life: A Prospective Cohort Study. *Acta Derm Venereol* (2020) 100:adv00320. doi: 10.2340/00015555-3683
46. Chuah SY, Tan SH, Chua SH, Tang MBY, Lim YL, Neoh CY, et al. A Retrospective Review of the Therapeutic Response With Remission in Patients With Newly Diagnosed Bullous Pemphigoid. *Australas J Dermatol* (2014) 55:149–51. doi: 10.1111/ajd.12040
47. Lytyn Y, Rahat S, Mufli A, Witol A, Bagit A, Sachdeva M, et al. Biologic Treatment Outcomes in Mucous Membrane Pemphigoid: A Systematic Review. *J Am Acad Dermatol* (2021) S0190-9622(21)00010-4. doi: 10.1016/j.jaad.2020.12.056
48. Castel M, Alexandre M, Jelti L, Pham-Ledard A, Viguier M, Bedane C, et al. Updated French Guidelines for the Therapeutic Management of Bullous Pemphigoid. *Ann Dermatol Venereol* (2021) S0151-9638(21)00088-0. doi: 10.1016/j.annder.2021.08.005
49. Feliciani C, Joly P, Jonkman MF, Zambruno G, Zillikens D, Ioannides D, et al. Management of Bullous Pemphigoid: The European Dermatology Forum Consensus in Collaboration with the European Academy of Dermatology and Venereology. *Br J Dermatol* (2015) 172:867–77. doi: 10.1111/bjd.13717
50. Schmidt E, Rashid H, Marzano A v., Lamberts A, Di Zenzo G, Diercks G, et al. European Guidelines (S3) on Diagnosis and Management of Mucous Membrane Pemphigoid, Initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology – Part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2021) 35:1926–48. doi: 10.1111/jdv.17395
51. Liu Y, Wang Y, Chen X, Jin H, Li L. Factors Associated With the Activity and Severity of Bullous Pemphigoid: A Review. *Ann Med* (2020) 52:55–62. doi: 10.1080/07853890.2020.1742367
52. Berkani N, Joly P, Golinski M-L, Colliou N, Lim A, Larbi A, et al. B-Cell Depletion Induces a Shift in Self Antigen Specific B-Cell Repertoire and Cytokine Pattern in Patients With Bullous Pemphigoid. *Sci Rep* (2019) 9:3525. doi: 10.1038/s41598-019-40203-7
53. Bernard P, Reguiai Z, Tancrede-Bohin E, Cordel N, Plantin P, Pauwels C, et al. Risk Factors for Relapse in Patients With Bullous Pemphigoid in Clinical Remission: A Multicenter, Prospective, Cohort Study. *Arch Dermatol* (2009) 145:537–42. doi: 10.1001/archdermatol.2009.53

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.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Alexandre, Bohelay, Gilk, Le Roux-Villet, Soued, Morin, Caux, Grootenboer-Mignot and Prost-Squarcioni. 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.

Annexe VI



Pemphigus (PDAI)

Pemphigus Disease Area Index (PDAI),

- Skin		- Activity		- Damage
Anatomical Location	Erosion / Blisters or new erythema		Number lesions if ≤ 3	Post-inflammatory hyperpigmentation or erythema from resolving lesion
	0	absent		0 absent
	1	1-3 lesions up to one > 2 cm in any diameter, none > 6 cm		1 present
	2	2-3 lesions, at least two > 2 cm diameter, none > 6 cm		
	3	> 3 lesions, none > 6 cm diameter		
	5	> 3 lesions, and/or at least one > 6 cm		
	10	> 3 lesions, and/or at least one lesion > 16 cm diameter or entire area		
Ears				
Nose				
Rest of the face				
Neck				
Chest				
Abdomen				
Back, buttocks				
Arms				
Hands				
Legs				
Feet				
Genitals				
Total skin		/120		/12

- Scalp		Erosion/Blisters or new erythema		Number lesions if ≤ 3	Post-inflammatory hyperpigmentation or erythema from resolving lesion
	0	absent			0 absent
	1	in one quadrant			1 present
	2	two quadrants			
	3	three quadrants			
	4	affects whole skull			
	10	at least one lesion > 6 cm			
Total Scalp (0-10)		/10			/1

Mucous membrane

Anatomical location	Erosion/Blisters	Number lesions if ≤ 3
	0 absent	
	1 1 lesion	
	2 2-3 lesions	
	5 > 3 lesions or 2 lesions > 2 cm	
	10 entire area	
Eyes		
Nose		
Buccal mucosa		
Hard palate		
Soft palate		
Upper gingiva		
Lower gingiva		
Tongue		
Floor of mouth		
Labial buccosa		
Posterior pharynx		
Anogenital		
Total Mucosa		/120

Total Activity Score (total skin + total Scalp + total Mucosa) :

Total Damage Score :

Références

1. Egami S, Yamagami J, Amagai M. Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145:1031-47.
2. Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, et al. The First International Consensus on Mucous Membrane Pemphigoid: Definition, Diagnostic Criteria, Pathogenic Factors, Medical Treatment, and Prognostic Indicators. *Arch Dermatol.* 2002;138:370-9.
3. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet.* 2019;394:882-94.
4. Rashid H, Lamberts A, Borradori L, et al. European guidelines (S3) on diagnosis and management of mucous membrane pemphigoid, initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology – Part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021;35:1750-64.
5. Eyerich S, Eyerich K, Traidl-Hoffmann C, Biedermann T. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends Immunol.* 2018;39:315-27.
6. Someya T, Amagai M. Toward a new generation of smart skins. *Nat Biotechnol.* 2019;37:382-8.
7. Wang ZH, Liu LP, Zheng YW. Melanocyte stem cells in skin diseases and their potential in cell-based therapy. *Histol Histopathol.* 2022;18470.
8. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30:30-41.
9. Wang JX, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M. Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *J Cell Commun Signal.* 2016;10:191-6.
10. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:125-33.
11. Bennett CL, Ambler CA. Editorial: Langerhans Cells and How Skin Pathology Reshapes the Local Immune Environment. *Front Immunol.* 2019;10:139.
12. Clayton K, Vallejo AF, Davies J, et al. Langerhans Cells-Programmed by the Epidermis. *Front Immunol.* 2017;8:1676.
13. Oss-Ronen L, Cohen I. Epigenetic regulation and signalling pathways in Merkel cell development. *Exp Dermatol.* 2021;30:1051-64.
14. Briggaman RA, Wheeler CE. The Epidermal-Dermal Junction. *J Invest Dermatol.* 1975;65:71-84.
15. McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci.* 2003;31:169-77.
16. Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci.* 1998;111:2477-86.
17. Yang Y, Dowling J, Yu QC, Kouklis P, Cleveland DW, Fuchs E. An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell.* 1996;86:655-65.
18. Nikolic B, Mac Nulty E, Mir B, Wiche G. Basic amino acid residue cluster within nuclear targeting sequence motif is essential for cytoplasmic plectin-vimentin network junctions. *J Cell Biol.* 1996;134:1455-67.

19. Borradori L, Chavanas S, Schaapveld RQ, et al. Role of the bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in the assembly of hemidesmosomes and cell adhesion-reexpression of BP180 in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa keratinocytes. *Exp Cell Res.* 1998;239:463-76.
20. Schaapveld RQ, Borradori L, Geerts D, et al. Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol.* 1998;142:271-84.
21. Niessen CM, Hulsman EH, Oomen LC, Kuikman I, Sonnenberg A. A minimal region on the integrin beta4 subunit that is critical to its localization in hemidesmosomes regulates the distribution of HD1/plectin in COS-7 cells. *J Cell Sci.* 1997;110:1705-16.
22. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. Analysis of wound healing in an in vitro model: early appearance of laminin and a 125 x 10³ Mr polypeptide during adhesion complex formation. *J Cell Sci.* 1990;96:651-60.
23. Aho S, Uitto J. Direct interaction between the intracellular domains of bullous pemphigoid antigen 2 (BP180) and beta 4 integrin, hemidesmosomal components of basal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243:694-9.
24. Masunaga T, Shimizu H, Yee C, et al. The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol.* 1997;109:200-6.
25. Hirako Y, Usukura J, Uematsu J, et al. Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem.* 1998;273:9711-7.
26. Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:651-8.
27. Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, et al. Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci.* 1996;109:2509-20.
28. Marinkovich MP, Lunstrum GP, Burgeson RE. The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J Biol Chem.* 1992;267:17900-6.
29. Morris NP, Keene DR, Glanville RW, Bentz H, Burgeson RE. The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. *J Biol Chem.* 1986;261:5638-44.
30. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1986;103:1577-86.
31. Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, Champlaud MF, Rest M, Burgeson RE. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol.* 1997;138:719-28.
32. Egu DT, Schmitt T, Waschke J. Mechanisms Causing Acantholysis in Pemphigus-Lessons from Human Skin. *Front Immunol.* 2022;13:884067.
33. Harrison OJ, Brasch J, Lasso G, et al. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:7160-5.
34. Ishii K, Yoshida K, Stanley JR, Yamagami J, Amagai M, Ishiko A. Pemphigus Vulgaris and Foliaceus IgG Autoantibodies Directly Block Heterophilic Transinteraction between Desmoglein and Desmocollin. *J Invest Dermatol.* 2020;140:1919-26.e7.
35. Fichtner D, Lorenz B, Engin S, et al. Covalent and Density-Controlled Surface Immobilization of E-Cadherin for Adhesion Force Spectroscopy. *PLOS ONE.* 2014;9:e93123.

36. Oh J, Byrd AL, Park M, NISC Comparative Sequencing Program, Kong HH, Segre JA. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell*. 2016;165:854-66.
37. Chinnappan M, Harris-Tryon TA. Novel mechanisms of microbial crosstalk with skin innate immunity. *Exp Dermatol*. 2021;30:1484-95.
38. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499-511.
39. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J*. 2009;420:1-16.
40. Mu R, Campos de Souza S, Liao Z, Dong L, Wang C. Reprogramming the immune niche for skin tissue regeneration - From cellular mechanisms to biomaterials applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;185:114298.
41. Abdallah F, Mijouin L, Pichon C. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5095293.
42. Cronkite DA, Strutt TM. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. *J Immunol Res*. 2018;2018:1467538.
43. Gerner MY, Torabi-Parizi P, Germain RN. Strategically localized dendritic cells promote rapid T cell responses to lymph-borne particulate antigens. *Immunity*. 2015;42:172-85.
44. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2017;8:292.
45. Jacobelli J, Buser AE, Heiden DL, Friedman RS. Autoimmunity in motion: Mechanisms of immune regulation and destruction revealed by in vivo imaging. *Immunol Rev*. 2022;306:181-99.
46. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S33-40.
47. Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell*. 2004;116: 299-311.
48. Alcover A, Alarcón B, Di Bartolo V. Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:103-25.
49. Jani PK, Kubagawa H, Melchers F. A rheostat sets B-cell receptor repertoire selection to distinguish self from non-self. *Curr Opin Immunol*. 2020;67:42-9.
50. Kim HP, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med*. 2007;204:1543-51.
51. Harms Pritchard G, Hall AO, Christian DA, et al. Diverse roles for T-bet in the effector responses required for resistance to infection. *J Immunol*. 2015;194:1131-40.
52. Zhang WX, Yang SY. Cloning and characterization of a new member of the T-box gene family. *Genomics*. 2000;70:41-8.
53. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*. 2006;16:3-10.
54. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*. 2006;126:1121-33.

55. Donnadieu E, Reisinger KB, Scharf S, et al. Landscape of T Follicular Helper Cell Dynamics in Human Germinal Centers. *J Immunol.* 2020;205:1248-55.
56. Sanz I, Wei C, Jenks SA, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol.* 2019;10:2458.
57. Methot SP, Di Noia JM. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv Immunol.* 2017;133:37-87.
58. Stewart A, Ng JCF, Wallis G, et al. Single-Cell Transcriptomic Analyses Define Distinct Peripheral B Cell Subsets and Discrete Development Pathways. *Front Immunol.* 2021;12:602539.
59. Glass DR, Tsai AG, Oliveria JP, et al. An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity. *Immunity.* 2020;53:217-232.e5.
60. He S, Wang LH, Liu Y, et al. Single-cell transcriptome profiling of an adult human cell atlas of 15 major organs. *Genome Biol.* 2020;21:294.
61. de Taeye SW, Rispens T, Vidarsson G. The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies (Basel).* 2019;8:E30.
62. Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, et al. The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv.* 2018;4:eaau1199.
63. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
64. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S41-52.
65. Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, Andersen JT, Sandlie I, Blumberg RS. The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front Immunol.* 2019;10:1540.
66. Pereira NA, Chan KF, Lin PC, Song Z. The « less-is-more » in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *MAbs.* 2018;10:693-711.
67. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol.* 2017;18:716-24.
68. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14:377-91.
69. Anderson MS, Su MA. AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:247-58.
70. 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;214:3183-95.
71. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12:431-40.
72. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* nov 2005;6(11):1142-51.
73. Klein L, Robey EA, Hsieh CS. Central CD4⁺ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:7-18.

74. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 2003;426:454-60.
75. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330-6.
76. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013;14:307-8.
77. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 2004;199:1401-8.
78. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J Exp Med*. 2010;207:1701-11.
79. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198:1875-86.
80. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2007;178:4022-6.
81. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:523-32.
82. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322:271-5.
83. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011;332:600-3.
84. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004;21:589-601.
85. Yao Y, Vent-Schmidt J, McGeough MD, et al. Tr1 Cells, but Not Foxp3+ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10-Dependent Mechanism. *J Immunol*. 2015;195:488-97.
86. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol*. 2007;178:179-85.
87. Getahun A. Role of inhibitory signaling in peripheral B cell tolerance. *Immunol Rev*. 2022;307:27-42.
88. Laumont CM, Banville AC, Gilardi M, Hollern DP, Nelson BH. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2022;22:414-30.
89. Sng J, Ayoglu B, Chen JW, et al. AIRE expression controls the peripheral selection of autoreactive B cells. *Sci Immunol*. 2019;4:eaav6778.
90. Finney J, Watanabe A, Kelsoe G, Kuraoka M. Minding the gap: The impact of B-cell tolerance on the microbial antibody repertoire. *Immunol Rev*. 2019;292:24-36.
91. Meffre E, O'Connor KC. Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies. *Immunol Rev*. 2019;292:90-101.

92. Sabouri Z, Schofield P, Horikawa K, 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:E2567-2575.
93. Duong BH, Tian H, Ota T, 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;207:173-87.
94. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 2002;16:219-30.
95. Mouquet H, Musette P, Gougeon ML, et al. B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. *J Invest Dermatol*. 2008;128:2859-69.
96. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 2010;40:2686-91.
97. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*. 2011;186:5569-79.
98. Wang EY, Mao T, Klein J, et al. Diverse Functional Autoantibodies in Patients with COVID-19. *Nature*. 2021 ;595:283-288.
99. Qiu CC, Caricchio R, Gallucci S. Triggers of Autoimmunity: The Role of Bacterial Infections in the Extracellular Exposure of Lupus Nuclear Autoantigens. *Front Immunol*. 2019;10:2608.
100. Schmidt E, Rashid H, Marzano AV, et al. European Guidelines (S3) on diagnosis and management of mucous membrane pemphigoid, initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology - Part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021;35:1926-48.
101. Joly P, Horwath B, Patsatsi A, et al. Updated S2K guidelines on the management of pemphigus vulgaris and foliaceus initiated by the european academy of dermatology and venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34:1900-1913.
102. Prost-Squarcioni C, Caux F, Schmidt E, et al. International Bullous Diseases Group: consensus on diagnostic criteria for epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol*. 2018;179:30-41.
103. Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol*. 2011;29:432-6.
104. Jelti L, Cordel N, Gillibert A, et al. Incidence and Mortality of Pemphigus in France. *J Invest Dermatol*. 2019;139:469-73.
105. Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, et al. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. *J Invest Dermatol*. 1995;104:302-5.
106. 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;136:2495-8.
107. Kridin K, Zelber-Sagi S, Bergman R. Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus: Differences in Epidemiology and Mortality. *Acta Derm Venereol*. 2017;97:1095-9.
108. Didona D, Maglie R, Eming R, Hertl M. Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies. *Front Immunol*. 2019;10:1418.

109. Shamim T, Varghese VI, Shameena PM, Sudha S. Pemphigus vulgaris in oral cavity: clinical analysis of 71 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:E622-626.
110. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011;9:844-56.
111. De D, Kumar S, Handa S, Mahajan R. Fingernail involvement in pemphigus and its correlation with disease severity and other clinicodemographic parameters. *Br J Dermatol*. 2019;180:662-3.
112. Tamazian S, Simpson CL. Autoimmune bullous disease in skin of color: A case series. *JAAD Case Rep*. 2020;6:1173-8.
113. Foster ML, Spaulding RT, Schadt CR. Neonatal Pemphigus Vulgaris. *JAMA Dermatol*. 2021;157:220.
114. Zhao CY, Chiang YZ, Murrell DF. Neonatal Autoimmune Blistering Disease: A Systematic Review. *Pediatr Dermatol*. 2016;33:367-74.
115. Gonçalves GAP, Brito MMC, Salathiel AM, Ferraz TS, Alves D, Roselino AMF. Incidence of pemphigus vulgaris exceeds that of pemphigus foliaceus in a region where pemphigus foliaceus is endemic: analysis of a 21-year historical series. *An Bras Dermatol*. 2011;86:1109-12.
116. 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;103:461-8.
117. Amerian ML, Ahmed AR. Pemphigus erythematosus. Senear-Usher syndrome. *Int J Dermatol*. 1985;24:16-25.
118. Khachemoune A, Guldbakke KK, Ehram E. Pemphigus foliaceus: a case report and short review. *Cutis*. 2006;78:105-10.
119. Malik M, Ahmed AR. Concurrence of systemic lupus erythematosus and pemphigus: coincidence or correlation? *Dermatology*. 2007;214:231-9.
120. Pérez-Pérez ME, Avalos-Díaz E, Herrera-Esparza R. Autoantibodies in senear-usher syndrome: cross-reactivity or multiple autoimmunity? *Autoimmune Dis*. 2012;2012:296214.
121. 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;42:18-26.
122. Mintz EM, Morel KD. Clinical features, diagnosis, and pathogenesis of chronic bullous disease of childhood. *Dermatol Clin*. 2011;29:459-62, ix.
123. Abrèu-Velez AM, Hashimoto T, et al. A unique form of endemic pemphigus in northern Colombia. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49:599-608.
124. Abrèu-Velez AM, Beutner EH, Montoya F, Bollag WB, Hashimoto T. Analyses of autoantigens in a new form of endemic pemphigus foliaceus in Colombia. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49:609-14.
125. Abida O, Masmoudi A, Rebaï A, et al. The familial feature of Tunisian endemic pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol*. 2009;161:951-3.
126. Mahé A, Flageul B, Cissé I, Kéita S, Bobin P. Pemphigus in Mali: a study of 30 cases. *Br J Dermatol*. 1996;134:114-9.
127. Morini JP, Jomaa B, Gorgi Y, et al. Pemphigus foliaceus in young women. An endemic focus in the Sousse area of Tunisia. *Arch Dermatol*. 1993;129:69-73.

128. Paolino G, Didona D, Magliulo G, et al. Paraneoplastic Pemphigus: Insight into the Autoimmune Pathogenesis, Clinical Features and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
129. Yatim A, Bohelay G, Grootenboer-Mignot S, et al. Paraneoplastic Pemphigus Revealed by Anti-programmed Death-1 Pembrolizumab Therapy for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Complicating Hidradenitis Suppurativa. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:249.
130. Leger S, Picard D, Ingen-Housz-Oro S, et al. Prognostic Factors of Paraneoplastic Pemphigus. *Archives of Dermatology.* 2012;148:1165-72.
131. Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, et al. Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med.* 1990;323:1729-35.
132. Joly P, Richard C, Gilbert D, et al. Sensitivity and specificity of clinical, histologic, and immunologic features in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2000;43:619-26.
133. Ohzono A, Sogame R, Li X, et al. Clinical and immunological findings in 104 cases of paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol.* 2015;173:1447-52.
134. Amagai M, Nishikawa T, Nousari HC, Anhalt GJ, Hashimoto T. Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. *J Clin Invest.* 1998;102:775-82.
135. Brandt O, Rafei D, Podstawa E, et al. Differential IgG recognition of desmoglein 3 by paraneoplastic pemphigus and pemphigus vulgaris sera. *J Invest Dermatol.* 2012;132:1738-41.
136. Mahoney MG, Aho S, Uitto J, Stanley JR. The members of the plakin family of proteins recognized by paraneoplastic pemphigus antibodies include periplakin. *J Invest Dermatol.* 1998;111:308-13.
137. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, et al. Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol.* 1995;104:829-34.
138. Kim SC, Kwon YD, Lee IJ, Chang SN, Lee TG. cDNA cloning of the 210-kDa paraneoplastic pemphigus antigen reveals that envoplakin is a component of the antigen complex. *J Invest Dermatol.* 1997;109:365-9.
139. Kazerounian S, Mahoney MG, Uitto J, Aho S. Envoplakin and periplakin, the paraneoplastic pemphigus antigens, are also recognized by pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Invest Dermatol.* 2000;115:505-7.
140. Maier L, Udvardi A, Hertl M, et al. Paraneoplastic pemphigus with anti-BP180 autoantibodies and Castleman disease. *Br J Dermatol.* 2017;176:824-6.
141. Schepens I, Jaunin F, Begre N, et al. The protease inhibitor alpha-2-macroglobulin-like-1 is the p170 antigen recognized by paraneoplastic pemphigus autoantibodies in human. *PLoS One.* 2010;5:e12250.
142. von Köckritz A, Ständer S, Zeidler C, Metze D, Luger T, Bonsmann G. Successful monotherapy of pemphigus vegetans with minocycline and nicotinamide. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:85-8.
143. Cozzani E, Christana K, Mastrogiacomo A, et al. Pemphigus vegetans Neumann type with anti-desmoglein and anti-periplakin autoantibodies. *Eur J Dermatol.* 2007;17:530-3.

144. Mergler R, Kerstan A, Schmidt E, Goebeler M, Benoit S. Atypical Clinical and Serological Manifestation of Pemphigus Vegetans: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Dermatol.* 2017;9:121-30.
145. Zaraa I, Sellami A, Bouguerra C, et al. Pemphigus vegetans: a clinical, histological, immunopathological and prognostic study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:1160-7.
146. Hashimoto K, Hashimoto T, Higashiyama M, et al. Detection of anti-desmocollins I and II autoantibodies in two cases of Hallopeau type pemphigus vegetans by immunoblot analysis. *J Dermatol Sci.* 1994;7:100-6.
147. Geller S, Gat A, Zeeli T, et al. The expanding spectrum of IgA pemphigus: a case report and review of the literature. *Br J Dermatol.* 2014;171:650-6.
148. Kridin K, Patel PM, Jones VA, Cordova A, Amber KT. IgA pemphigus: A systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82:1386-92.
149. Jablonska S, Chorzelski TP, Beutner EH, Chorzelska J. Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. *Int J Dermatol.* 1975;14:353-9.
150. Costa LMC, Cappel MA, Keeling JH. Clinical, pathologic, and immunologic features of pemphigus herpetiformis: a literature review and proposed diagnostic criteria. *Int J Dermatol.* 2019;58:997-1007.
151. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, et al. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:117-22.
152. On HR, Hashimoto T, Kim SC. Pemphigus herpetiformis with IgG autoantibodies to desmoglein 1 and desmocollin 1. *Br J Dermatol.* 2015;172:1144-6.
153. Vodo D, Sarig O, Sprecher E. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:226.
154. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, et al. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:5056-60.
155. Loiseau P, Lecleach L, Prost C, et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun.* 2000;15:67-73.
156. Shams S, Amirzargar AA, Yousefi M, et al. HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Immunol.* 2009;29:175-9.
157. Brochado MJF, Nascimento DF, Campos W, et al. Differential HLA class I and class II associations in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris patients from a prevalent Southeastern Brazilian region. *J Autoimmun.* 2016;72:19-24.
158. Gazit E, Loewenthal R. The immunogenetics of pemphigus vulgaris. *Autoimmun Rev.* 2005;4:16-20.
159. Gao J, Zhu C, Zhang Y, et al. Association Study and Fine-Mapping Major Histocompatibility Complex Analysis of Pemphigus Vulgaris in a Han Chinese Population. *J Invest Dermatol.* 2018;138:2307-14.
160. Martel P, Loiseau P, Joly P, et al. Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1*03 allele. *J Autoimmun.* 2003;20:91-5.

161. Liu Q, Bu DF, Li D, Zhu XJ. Genotyping of HLA-I and HLA-II alleles in Chinese patients with paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol.* 2008;158:587-91.
162. Yan L, Wang JM, Zeng K. Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2012;167:768-77.
163. Li S, Zhang Q, Wang P, et al. Association between HLA-DQB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: A meta-analysis. *Immunol Invest.* 2018;47:101-12.
164. Hashimoto K, Miki Y, Nakata S, Matsuyama M. HLA-A10 in pemphigus among Japanese. *Arch Dermatol.* 1977;113:1518-9.
165. Miyagawa S, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T. Genotyping for HLA-A, B and C alleles in Japanese patients with pemphigus: prevalence of Asian alleles of the HLA-B15 family. *Br J Dermatol.* 2002;146:52-8.
166. Capon F, Bharkhada J, Cochrane NE, et al. Evidence of an association between desmoglein 3 haplotypes and pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol.* 2006;154:67-71.
167. Yamagami J, Kacir S, Ishii K, Payne AS, Siegel DL, Stanley JR. Antibodies to the desmoglein 1 precursor proprotein but not to the mature cell surface protein cloned from individuals without pemphigus. *J Immunol.* 2009;183:5615-21.
168. Lim YL, Bohelay G, Hanakawa S, Musette P, Janela B. Autoimmune Pemphigus: Latest Advances and Emerging Therapies. *Front Mol Biosci.* 2021;8:808536.
169. Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. *Hum Immunol.* 2010;71:809-17.
170. Tanasilovic S, Popadic S, Medenica L, Popadic D. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus determined by CD86 and CTLA4 polymorphisms. *Clin Dermatol.* 2017;35:236-41.
171. Dey-Rao R, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Genome-wide expression analysis suggests unique disease-promoting and disease-preventing signatures in Pemphigus vulgaris. *Genes Immun.* 2013;14:487-99.
172. Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, 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;343:23-30.
173. Qian Y, Jeong JS, Maldonado M, et al. Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. *J Immunol.* 2012;189:1535-9.
174. Reis VM, Toledo RP, Lopez A, Diaz LA, Martins JE. UVB-induced acantholysis in endemic Pemphigus foliaceus (Fogo selvagem) and Pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:571-6.
175. Valikhani M, Kavusi S, Chams-Davatchi C, et al. Impact of smoking on pemphigus. *Int J Dermatol.* 2008;47:567-70.
176. Ghaedi F, Etesami I, Aryanian Z, et al. Drug-induced pemphigus: A systematic review of 170 patients. *Int Immunopharmacol.* 2021;92:107299.
177. Ruocco V, De Angelis E, Lombardi ML. Drug-induced pemphigus. II. Pathomechanisms and experimental investigations. *Clin Dermatol.* 1993;14:507-13.

178. Wolf R, Ruocco V. Gaining more insight into the pathomechanisms of thiol-induced acantholysis. *Med Hypotheses*. 1997;48:107-10.
179. Shoenfeld Y, Aharon-Maor A, Sherer Y. Vaccination as an additional player in the mosaic of autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;18:181-4.
180. Horwitz MS, Sarvetnick N. Viruses, host responses, and autoimmunity. *Immunol Rev*. 1999;169:241-53.
181. Brenner S, Sasson A, Sharon O. Pemphigus and infections. *Clin Dermatol*. 2002;20:114-8.
182. 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.
183. 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.
184. Dmochowski M, Hashimoto T, Nishikawa T. The analysis of IgG subclasses of anti-intercellular antibodies in pemphigus by an immunoblot technique. *Arch Dermatol Res*. 1992;284:309-11.
185. Wilson CL, Wojnarowska F, Dean D, Pasricha JS. IgG subclasses in pemphigus in Indian and UK populations. *Clin Exp Dermatol*. 1993;18:226-30.
186. Allen EM, Giudice GJ, Diaz LA. Subclass reactivity of pemphigus foliaceus autoantibodies with recombinant human desmoglein. *J Invest Dermatol*. 1993;100:685-91.
187. Payne AS, Ishii K, Kacir S, et al. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *J Clin Invest*. 2005;115:888-99.
188. Saleh MA, Hashimoto R, Kase Y, Amagai M, Yamagami J. Low pathogenicity of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G autoantibodies contributes to the atypical clinical phenotypes in pemphigus. *J Dermatol*. 2015;42:685-9.
189. Cho A, Caldara AL, Ran NA, et al. Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. *Cell Rep*. 2019;28:909-922.e6.
190. Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Khamesipour A, et al. Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris: correlation with phenotype, severity, and disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21:1319-24.
191. Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, 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;19:458-63.
192. Belloni-Fortina A, Faggion D, Pigozzi B, 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.
193. Yoshida K, Ishii K, Shimizu A, 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;85:197-207.
194. 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;294:4520-8.

195. Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, et al. Detection of antibodies against the non-calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris and their pathogenic significance. *Br J Dermatol.* 2012;167:252-61.
196. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest.* 1992;90:919-26.
197. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, et al. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol.* 2003;170:2170-8.
198. Bhol KC, Ahmed AR. Production of non-pathogenic human monoclonal antibodies to desmoglein 3 from pemphigus vulgaris patient. *Autoimmunity.* 2002;35:87-91.
199. Lo AS, Mao X, Mukherjee EM, 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:e0156800.
200. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, et al. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol.* 2001;167:5439-48.
201. Chan PT, Ohyama B, Nishifuji K, et al. Immune response towards the amino-terminus of desmoglein 1 prevails across different activity stages in nonendemic pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol.* 2010;162:1242-50.
202. Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, et al. A higher correlation of the antibody activities against the calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 quantified by ethylenediaminetetraacetic acid-treated enzyme-linked immunosorbent assay with clinical disease activities of pemphigus vulgaris. *J Dermatol Sci.* 2013;70:190-5.
203. Amagai M, Stanley JR. Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol.* 2012;132:776-84.
204. Sigmund AM, Steinert LS, Egu DT, Bayerbach FC, Waschke J, Vielmuth F. Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus. *Front Immunol.* 2020;11:581370.
205. Koga H, Ohyama B, Tsuruta D, et al. Five Japanese cases of antidesmoglein 1 antibody-positive and antidesmoglein 3 antibody-negative pemphigus with oral lesions. *Br J Dermatol.* 2012;166:976-80.
206. Carew B, Wagner G. Cutaneous pemphigus vulgaris with absence of desmoglein 1 autoantibodies. An example of the extended desmoglein compensation theory. *Australas J Dermatol.* 2014;55:292-5.
207. Ahmed AR, Carrozzo M, Caux F, et al. Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. *Exp Dermatol.* 2016;25:839-46.
208. Heupel WM, Zillikens D, Drenckhahn D, Waschke J. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol.* 2008;181:1825-34.
209. Jennings JM, Tucker DK, Kottke MD, et al. Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3. *J Invest Dermatol.* 2011;131:706-18.
210. Saito M, Stahley SN, Caughman CY, et al. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One.* 2012;7:e50696.

211. Völlner F, Ali J, Kurrle N, et al. Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Sci Rep*. 2016;6:28820.
212. Schmitt T, Waschke J. Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:701809.
213. Puviani M, Marconi A, Cozzani E, Pincelli C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. *J Invest Dermatol*. 2003;120:164-7.
214. 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;103:12855-60.
215. Berkowitz P, Diaz LA, Hall RP, Rubenstein DS. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol*. 2008;128:738-40.
216. Kawasaki Y, Aoyama Y, Tsunoda K, et al. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. *Autoimmunity*. 2006;39:587-90.
217. Cirillo N, Lanza A, Prime SS. Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Exp Cell Res*. 2010;316:580-92.
218. Numata S, Teye K, Tsuruta D, et al. Anti- α -2-macroglobulin-like-1 autoantibodies are detected frequently and may be pathogenic in paraneoplastic pemphigus. *J Invest Dermatol*. 2013;133:1785-93.
219. Kalantari-Dehaghi M, Molina DM, et al. New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology. *Exp Dermatol*. 2011;20:154-6.
220. Amber KT, Valdebran M, Grando SA. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol*. 2018;9:1190.
221. Müller R, Heber B, Hashimoto T, et al. Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34:898-903.
222. Mindorf S, Dettmann IM, Krüger S, et al. Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus. *Exp Dermatol*. 2017;26:1267-70.
223. Spindler V, Heupel WM, Efthymiadis A, et al. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem*. 2009;284:30556-64.
224. Lakshmi MJD, Jaisankar TJ, Rajappa M, 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;76:895-902.
225. Chernyavsky A, Chen Y, Wang PH, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptosis. *Int Immunopharmacol*. 2015;29:76-80.
226. Kim SC, Chung YL, Kim J, Cho NJ, Amagai M. Pemphigus vulgaris with autoantibodies to desmoplakin. *Br J Dermatol*. 2001;145:838-40.
227. Nagasaka T, Nishifuji K, Ota T, Whittock NV, Amagai M. Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:1484-92.

228. Ishii M, Izumi J, Fujiwara H, Ito M, Hamada M. Immunoblotting detection of gamma-catenin (plakoglobin) antibody in the serum of a patient with paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol*. 2001;144:377-9.
229. Lambert J, Bracke S, van Roy F, Pas HH, Bonn  S, De Schepper S. Serum plakophilin-3 autoreactivity in paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol*. 2010;163:630-2.
230. Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem*. 2000;275:29466-76.
231. Oliveira MEF, Culton DA, Prisanh P, Qaqish BF, Diaz LA. E-cadherin autoantibody profile in patients with pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*. 2013;169:812-8.
232. Kalantari-Dehaghi M, Anhalt GJ, Camilleri MJ, et al. Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. *PLoS One*. 2013;8:e57587.
233. Chen J, Den Z, Koch PJ. Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. *J Cell Sci*. 2008;121:2844-9.
234. Rafei D, M ller R, Ishii N, et al. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *Am J Pathol*. 2011;178:718-23.
235. Spindler V, Eming R, Schmidt E, et al. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol*. 2018;138:32-7.
236. Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, 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;137:1091-102.
237. 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;105:625-31.
238. Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, et al. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. *Br J Dermatol*. 2004;151:346-54.
239. Ohshima B, Nishifuji K, Chan PT, et al. Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large-scale longitudinal study using desmoglein 2-based swapped molecules. *J Invest Dermatol*. 2012;132:1158-68.
240. Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, et al. Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest*. 1997;99:31-40.
241. 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;30:535-40.
242. Eming R, Büdinger L, Riechers R, , et al. Frequency analysis of autoreactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay. *Br J Dermatol*. 2000;143:1279-82.
243. 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*. 2003;170:635-42.

244. 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.* 2008;181:1526-35.
245. Eming R, Hennerici T, Bäcklund et al. Pathogenic IgG antibodies against desmoglein 3 in pemphigus vulgaris are regulated by HLA-DRB1*04:02-restricted T cells. *J Immunol.* 2014;193:4391-9.
246. 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.* 1993;150:3671-80.
247. Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, et al. T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol.* 2004;172:3883-92.
248. Satyam A, Khandpur S, Sharma VK, Sharma A. Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-Pemphigus vulgaris. *Immunol Invest.* 2009;38:498-509.
249. Lee SH, Hong WJ, Kim SC. Analysis of Serum Cytokine Profile in Pemphigus. *Ann Dermatol.* 2017;29:438-45.
250. 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;32:114-23.
251. Xu RC, Zhu HQ, Li WP, et al. The imbalance of Th17 and regulatory T cells in pemphigus patients. *Eur J Dermatol.* 2013;23:795-802.
252. Timoteo RP, da Silva MV, Miguel CB, et al. Th1/Th17-Related Cytokines and Chemokines and Their Implications in the Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:7151285.
253. Ben Jmaa M, Abida O, Fakhfakh R, et al. Involvement of the IL23/Th17 Pathway in the Pathogenesis of Tunisian Pemphigus Foliaceus. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:8206983.
254. Holstein J, Solimani F, Baum C, et al. Immunophenotyping in pemphigus reveals a TH17/TFH17 cell-dominated immune response promoting desmoglein1/3-specific autoantibody production. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147:2358-69.
255. Asothai R, Anand V, Das D, 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.
256. Maho-Vaillant M, Perals C, Golinski ML, et al. Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. *J Invest Dermatol.* 2021;141:2132-2140.e1.
257. Arakawa M, Dainichi T, Yasumoto S, Hashimoto T. Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Dermatol Sci.* 2009;53:228-31.
258. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, 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;34:108-21.
259. Craft JE. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8:337-47.

260. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, 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.
261. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol*. 2014;35:436-42.
262. Hennerici T, Pollmann R, Schmidt T, et al. Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. *PLoS ONE*. 2016;11:e0148919.
263. Kim AR, Han D, Choi JY, et al. Targeting inducible costimulator expressed on CXCR5+PD-1+ TH cells suppresses the progression of pemphigus vulgaris. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146:1070-1079.e8.
264. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151-64.
265. Mignard C, Maho-Vaillant M, Golinski ML, 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;156:545-52.
266. Yokoyama T, Matsuda S, Takae Y, et al. Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. *Int Immunol*. 2011;23:365-73.
267. 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*. 2004;172:6468-75.
268. Bassler K, Schulte-Schrepping J, Warnat-Herresthal S, Aschenbrenner AC, Schultze JL. The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:269-93.
269. Del Fresno C, Saz-Leal P, Enamorado M, et al. DNGR-1 in dendritic cells limits tissue damage by dampening neutrophil recruitment. *Science*. 2018;362:351-6.
270. Janela B, Patel AA, Lau MC, et al. A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGF α -Mediated Recruitment of Neutrophils. *Immunity*. 2019;50:1069-1083.e8.
271. 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*. 1998;110:388-92.
272. Das D, Singh A, Antil PS, et al. Distorted frequency of dendritic cells and their associated stimulatory and inhibitory markers augment the pathogenesis of pemphigus vulgaris. *Immunol Res*. 2020;68:353-62.
273. Kitashima DY, Kobayashi T, Woodring T, et al. Langerhans Cells Prevent Autoimmunity via Expansion of Keratinocyte Antigen-Specific Regulatory T Cells. *EBioMedicine*. 2018;27:293-303.
274. Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2010;184:3106-16.
275. Oktem A, Horzum U, Ertop P, et al. Clinical Relevance of Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells in Autoimmune-Blistering Disorders Pemphigus Vulgaris and Bullous Pemphigoid. *J Invest Dermatol*. 2021;141:672-675.e1.

276. Neri D, Carevic-Neri M, Brück J, et al. Arginase 1+ IL-10+ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells are elevated in patients with active pemphigus and correlate with an increased Th2/Th1 response. *Exp Dermatol*. 2021;30:782-91.
277. Dress RJ, Dutertre CA, Giladi A, et al. Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D+ lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat Immunol*. 2019;20:852-64.
278. Ramadan N, Kurban M, Abbas O. Possible Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Pemphigus. *Ann Dermatol*. 2019;31:454-7.
279. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, et al. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*. 2006;176:4431-9.
280. Foster CA, Yokozeki H, Rappersberger K, et al. Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J Exp Med*. 1990;171:997-1013.
281. Allie SR, Randall TD. Resident Memory B Cells. *Viral Immunol*. 2020;33:282-93.
282. Zhou S, Liu Z, Yuan H, et al. Autoreactive B Cell Differentiation in Diffuse Ectopic Lymphoid-Like Structures of Inflamed Pemphigus Lesions. *J Invest Dermatol*. 2020;140:309-318.e8.
283. Silva-Sanchez A, Randall TD, Meza-Perez S. Tertiary Lymphoid Structures Among the World of Noncanonical Ectopic Lymphoid Organizations. *Methods Mol Biol*. 2018;1845:1-15.
284. Yin C, Mohanta S, Maffia P, Habenicht AJR. Editorial: Tertiary Lymphoid Organs (TLOs): Powerhouses of Disease Immunity. *Front Immunol*. 2017;8:228.
285. Jones GW, Jones SA. Ectopic lymphoid follicles: inducible centres for generating antigen-specific immune responses within tissues. *Immunology*. 2016;147:141-51.
286. Jones GW, Bombardieri M, Greenhill CJ, et al. Interleukin-27 inhibits ectopic lymphoid-like structure development in early inflammatory arthritis. *J Exp Med*. 2015;212:1793-802.
287. Siliņa K, Soltermann A, Attar FM, et al. Germinal Centers Determine the Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Structures and Are Impaired by Corticosteroids in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 2018;78:1308-20.
288. Humby F, Bombardieri M, Manzo A, et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med*. 2009;6:e1.
289. Bombardieri M, Barone F, Lucchesi D, Nayar S, van den Berg WB, Proctor G, et al. Inducible tertiary lymphoid structures, autoimmunity, and exocrine dysfunction in a novel model of salivary gland inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2012;189:3767-76.
290. Hsieh C, Chang A, Brandt D, Guttikonda R, Utset TO, Clark MR. Predicting outcomes of lupus nephritis with tubulointerstitial inflammation and scarring. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63:865-74.
291. Chang A, Henderson SG, Brandt D, et al. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol*. 2011;186:1849-60.
292. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, et al. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol*. 2005;174:864-70.
293. Hu D, Mohanta SK, Yin C, et al. Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Aorta Immunity and Protect against Atherosclerosis via Vascular Smooth Muscle Cell Lymphotoxin β Receptors. *Immunity*. 2015;42:1100-15.

294. Li W, Bribriescio AC, Nava RG, et al. Lung transplant acceptance is facilitated by early events in the graft and is associated with lymphoid neogenesis. *Mucosal Immunol.* 2012;5:544-54.
295. Vu Van D, Beier KC, Pietzke LJ, et al. Local T/B cooperation in inflamed tissues is supported by T follicular helper-like cells. *Nat Commun.* 2016;7:10875.
296. Ho AW, Kupper TS. T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:490-502.
297. Yuan H, Zhou S, Liu Z, et al. Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2017;137:2362-70.
298. Chen J, Zheng Q, Hammers CM, et al. Proteomic Analysis of Pemphigus Autoantibodies Indicates a Larger, More Diverse, and More Dynamic Repertoire than Determined by B Cell Genetics. *Cell Rep.* 2017;18:237-47.
299. Bystryn JC, Steinman NM. The adjuvant therapy of pemphigus. An update. *Arch Dermatol.* 1996;132:203-12.
300. Krain RL, Kushner CJ, Tarazi M, et al. Assessing the Correlation Between Disease Severity Indices and Quality of Life Measurement Tools in Pemphigus. *Front Immunol.* 2019;10:2571.
301. 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.
302. Shimba A, Ikuta K. Control of immunity by glucocorticoids in health and disease. *Semin Immunopathol.* 2020;42:669-80.
303. Ahmed AR, Moy R. Death in pemphigus. *J Am Acad Dermatol.* 1982;7:221-8.
304. Martin LK, Werth V, Villanueva E, Segall J, Murrell DF. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;CD006263.
305. Gooptu C, Staughton RC. Use of topical cyclosporin in oral pemphigus. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:860-1.
306. Hodgson TA, Malik F, Hegarty AM, Porter SR. Topical tacrolimus: a novel therapeutic intervention for recalcitrant labial pemphigus vulgaris. *Eur J Dermatol.* 2003;13:142-4.
307. Gambino A, Carbone M, Arduino PG, Carcieri P, Carbone L, Broccoletti R. Conservative approach in patients with pemphigus gingival vulgaris: a pilot study of five cases. *Int J Dent.* 2014;2014:747506.
308. Butler LA, Tam CS, Seymour JF. Dancing partners at the ball: Rational selection of next generation anti-CD20 antibodies for combination therapy of chronic lymphocytic leukemia in the novel agents era. *Blood Rev.* 2017;31:318-27.
309. Lightman SM, Utley A, Lee KP. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Front Immunol.* 2019;10:965.
310. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol.* 2004;16:119-29.
311. Bohelay G, Caux F, Musette P. Clinical and biological activity of rituximab in the treatment of pemphigus. *Immunotherapy.* 2021;13:35-53.

312. Reddy V, Cambridge G, Isenberg DA, Glennie MJ, Cragg MS, Leandro M. Internalization of rituximab and the efficiency of B Cell depletion in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015;67:2046-55.
313. Heizmann M, Itin P, Wernli M, Borradori L, Bargetzi MJ. Successful treatment of paraneoplastic pemphigus in follicular NHL with rituximab: report of a case and review of treatment for paraneoplastic pemphigus in NHL and CLL. *Am J Hematol*. 2001;66:142-4.
314. Salopek TG, Logsetty S, Tredget EE. Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) for the treatment of recalcitrant, life-threatening pemphigus vulgaris with implications in the pathogenesis of the disorder. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47:785-8.
315. 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.
316. Lunardon L, Tsai KJ, Propert KJ, et al. Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients. *Arch Dermatol*. 2012;148:1031-6.
317. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet*. 2017;389:2031-40.
318. Werth VP, Joly P, Mimouni D, et al. Rituximab versus Mycophenolate Mofetil in Patients with Pemphigus Vulgaris. *N Engl J Med*. 2021;384:2295-305.
319. Hébert V, Vermeulin T, Tanguy L, et al. Comparison of real costs in the French healthcare system in newly diagnosed patients with pemphigus for first-line treatment with rituximab vs. standard corticosteroid regimen: data from a national multicentre trial. *Br J Dermatol*. 2020 ;183(1):121-7.
320. Hammers CM, Chen J, Lin C, et al. Persistence of Anti-Desmoglein 3 IgG+ B-Cell Clones in Pemphigus Patients Over Years. *J Invest Dermatol*. 2015;135:742-9.
321. DiLillo DJ, Hamaguchi Y, Ueda Y, et al. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Immunol*. 2008;180:361-71.
322. 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.
323. Hébert V, Petit M, Maho-Vaillant M, 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.
324. 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.
325. 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;43:815-8.
326. 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;176:1204-12.
327. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:236-47.

328. Cao T, Shao S, Fang H, Li B, Wang G. Role of Regulatory Immune Cells and Molecules in Autoimmune Bullous Dermatoses. *Front Immunol.* 2019;10:1746.
329. Kushner CJ, Wang S, Tovanabutra N, Tsai DE, Werth VP, Payne AS. Factors Associated With Complete Remission After Rituximab Therapy for Pemphigus. *JAMA Dermatol.* 2019;155:1404-9.
330. Müller R, Hunzelmann N, Baur V, et al. Targeted immunotherapy with rituximab leads to a transient alteration of the IgG autoantibody profile in pemphigus vulgaris. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010:321950.
331. Cho A, Bradley B, Kauffman R, et al. Robust memory responses against influenza vaccination in pemphigus patients previously treated with rituximab. *JCI Insight.* 2017;2.
332. Gamonet C, Ferrand C, Colliou N, et al. Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus. *Exp Dermatol.* 2014;23:66-7.
333. Lunardon L, Payne AS. Inhibitory human anti-chimeric antibodies to rituximab in a pemphigus patient. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:800-3.
334. Chen DM, Oduyungbo A, Csinady E, et al. Rituximab is an effective treatment in patients with pemphigus vulgaris and demonstrates a steroid-sparing effect. *Br J Dermatol.* 2020;182:1111-9.
335. Bhattacharjee R, De D, Handa S, Minz RW, Saikia B, Joshi N. Assessment of the Effects of Rituximab Monotherapy on Different Subsets of Circulating T-Regulatory Cells and Clinical Disease Severity in Severe Pemphigus Vulgaris. *Dermatology (Basel).* 2016;232:572-7.
336. Ahmed AR, Shetty S. A comprehensive analysis of treatment outcomes in patients with pemphigus vulgaris treated with rituximab. *Autoimmun Rev.* 2015;14:323-31.
337. Balighi K, Kamran B, Daneshpazhoo M, et al. Adjuvant rituximab in the treatment of pemphigus vulgaris: a phase II clinical trial. *Int J Dermatol.* 2013;52:862-7.
338. Casulo C, Maragulia J, Zelenetz AD. Incidence of hypogammaglobulinemia in patients receiving rituximab and the use of intravenous immunoglobulin for recurrent infections. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13:106-11.
339. Md Yusof MY, Vital EM, McElvenny DM, et al. Predicting Severe Infection and Effects of Hypogammaglobulinemia During Therapy With Rituximab in Rheumatic and Musculoskeletal Diseases. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71:1812-23.
340. Ahmed AR, Aksoy M. IgM Deficiency in Autoimmune Blistering Mucocutaneous Diseases Following Various Treatments: Long Term Follow-Up and Relevant Observations. *Front Immunol.* 2021;12:727520.
341. Feldman RJ, Christen WG, Ahmed AR. Comparison of immunological parameters in patients with pemphigus vulgaris following rituximab and IVIG therapy. *Br J Dermatol.* 2012;166:511-7.
342. Bohelay G, Alexandre M, Le Roux-Villet C, et al. Rituximab Therapy for Mucous Membrane Pemphigoid: A Retrospective Monocentric Study With Long-Term Follow-Up in 109 Patients. *Front Immunol.* 2022;13:915205.
343. Kasperkiewicz M, Kowalewski C, Jabłońska S. Pemphigus herpetiformis: from first description until now. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70:780-7.
344. Werth VP, Culton DA, Concha JSS, et al. Safety, Tolerability, and Activity of ALXN1830 Targeting the Neonatal Fc Receptor in Chronic Pemphigus. *J Invest Dermatol.* 2021;141:2858-2865.e4.

345. Amagai M, Ikeda S, Hashimoto T, et al. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2017;85:77-84.
346. Grando SA. Retrospective analysis of a single-center clinical experience toward development of curative treatment of 123 pemphigus patients with a long-term follow-up: efficacy and safety of the multidrug protocol combining intravenous immunoglobulin with the cytotoxic immunosuppressor and mitochondrion-protecting drugs. *Int J Dermatol.* 2019;58:114-25.
347. Green MG, Bystryjn JC. Effect of intravenous immunoglobulin therapy on serum levels of IgG1 and IgG4 antidesmoglein 1 and antidesmoglein 3 antibodies in pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol.* 2008;144:1621-4.
348. Hamadah I, Chisti MA, Haider M, et al. Rituximab/IVIG in pemphigus - a 10-year study with a long follow-up. *J Dermatolog Treat.* 2019;30:170-5.
349. Behzad M, Möbs C, Kneisel A, et al. Combined treatment with immunoadsorption and rituximab leads to fast and prolonged clinical remission in difficult-to-treat pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol.* 2012;166:844-52.
350. Eming R, Rech J, Barth S, et al. Prolonged clinical remission of patients with severe pemphigus upon rapid removal of desmoglein-reactive autoantibodies by immunoadsorption. *Dermatology (Basel).* 2006;212:177-87.
351. Langenhan J, Dworschak J, Saschenbrecker S, et al. Specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus requires the entire ectodomains of desmogleins. *Exp Dermatol.* 2014;23:253-9.
352. Vinay K, Kanwar AJ, Mittal A, Dogra S, Minz RW, Hashimoto T. Intralesional Rituximab in the Treatment of Refractory Oral Pemphigus Vulgaris. *JAMA Dermatol.* 2015;151:878-82.
353. Iraj F, Danesh F, Faghihi G, et al. Comparison between the efficacy of intralesional rituximab versus intralesional triamcinolone in the treatment refractory Pemphigus Vulgaris lesions: A randomized clinical trial. *Int Immunopharmacol.* 2019;73:94-7.
354. Rapp M, Pentland A, Richardson C. Successful Treatment of Pemphigus Vulgaris With Ofatumumab. *J Drugs Dermatol.* 2018;17:1338-9.
355. Ellebrecht CT, Choi EJ, Allman DM, et al. Subcutaneous veltuzumab, a humanized anti-CD20 antibody, in the treatment of refractory pemphigus vulgaris. *JAMA Dermatol.* 2014;150:1331-5.
356. Reddy V, Klein C, Isenberg DA, et al. Obinutuzumab induces superior B-cell cytotoxicity to rituximab in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patient samples. *Rheumatology (Oxford).* 2017 ;56:1227-37.
357. Hébert V, Maho-Vaillant M, Golinski ML, et al. Modifications of the BAFF/BAFF-Receptor Axis in Patients With Pemphigus Treated With Rituximab Versus Standard Corticosteroid Regimen. *Front Immunol.* 2021;12:666022.
358. Möckel T, Basta F, Weinmann-Menke J, Schwarting A. B cell activating factor (BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev.* 2021;20:102736.
359. Kaegi C, Wuest B, Schreiner J, et al. Systematic Review of Safety and Efficacy of Rituximab in Treating Immune-Mediated Disorders. *Front Immunol.* 2019;10:1990.

360. Murrell DF, Patsatsi A, Stavropoulos P, et al. Proof of concept for the clinical effects of oral rilzabrutinib, the first Bruton tyrosine kinase inhibitor for pemphigus vulgaris: the phase II BELIEVE study. *Br J Dermatol.* 2021;185:745-55.
361. Blumberg LJ, Humphries JE, Jones SD, et al. Blocking FcRn in humans reduces circulating IgG levels and inhibits IgG immune complex-mediated immune responses. *Sci Adv.* 2019;5:eaax9586.
362. Zuercher AW, Spirig R, Baz Morelli A, Rowe T, Käsermann F. Next-generation Fc receptor-targeting biologics for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2019;18:102366.
363. Goebeler M, Bata-Csörgő Z, De Simone C, et al. Treatment of pemphigus vulgaris and foliaceus with efgartigimod, a neonatal Fc receptor inhibitor: a phase II multicentre, open-label feasibility trial. *Br J Dermatol.* 2022;186:429-39.
364. Assaf S, Malki L, Mayer T, et al. ST18 affects cell-cell adhesion in pemphigus vulgaris in a tumour necrosis factor- α -dependent fashion. *Br J Dermatol.* 2021;184:1153-60.
365. Mohanty R, Chowdhury CR, Arega S, Sen P, Ganguly P, Ganguly N. CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol Rep.* 2019;42:2183-95.
366. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, et al. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science.* 2016;353:179-84.
367. Lee J, Lundgren DK, Mao X, et al. Antigen-specific B cell depletion for precision therapy of mucosal pemphigus vulgaris. *J Clin Invest.* 2020;130:6317-24.
368. Leandro MJ. B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Res Ther.* 2013;15 Suppl 1:S3.
369. 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.
370. Pollman R, Walter E, Schmidt T, et al. Identification of Autoreactive B Cell Subpopulations in Peripheral Blood of Autoimmune Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol.* 2019;10:1375.
371. Saleh MA. A prospective study comparing patients with early and late relapsing pemphigus treated with rituximab. *J Am Acad Dermatol.* 2018;79:97-103.
372. Cambridge G, Perry HC, Nogueira L, et al. The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *J Autoimmun.* 2014;50:67-76.
373. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol.* 1992;149:735-42.
374. Dudziak D, Nimmerjahn F, Bornkamm GW, Laux G. Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation. *J Immunol.* 2005;174:6672-6.
375. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154:3821-35.
376. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2588-92.
377. Lechmann M, Kotzor N, Zinser E, Prechtel AT, Sticht H, Steinkasserer A. CD83 is a dimer: Comparative analysis of monomeric and dimeric isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329:132-9.

378. Grosche L, Knippertz I, König C, et al. The CD83 Molecule - An Important Immune Checkpoint. *Front Immunol.* 2020;11:721.
379. Berchtold S, Mühl-Zürbes P, Maczek E, Golka A, Schuler G, Steinkasserer A. Cloning and characterization of the promoter region of the human CD83 gene. *Immunobiology.* 2002;205:231-46.
380. Guo Y, Li R, Song X, et al. The expression and characterization of functionally active soluble CD83 by *Pichia pastoris* using high-density fermentation. *PLoS One.* 2014;9:e89264.
381. Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes and is detectable in normal human sera. *Int Immunol.* 2001;13:959-67.
382. Heilingloh CS, Klingl S, Egerer-Sieber C, et al. Crystal Structure of the Extracellular Domain of the Human Dendritic Cell Surface Marker CD83. *J Mol Biol.* 2017;429:1227-43.
383. Prazma CM, Yazawa N, Fujimoto Y, Fujimoto M, Tedder TF. CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo. *J Immunol.* 2007;179:4550-62.
384. Kozlow EJ, Wilson GL, Fox CH, Kehrl JH. Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. *Blood.* 1993;81:454-61.
385. Ju X, Silveira PA, Hsu WH, et al. The Analysis of CD83 Expression on Human Immune Cells Identifies a Unique CD83+-Activated T Cell Population. *J Immunol.* 2016;197:4613-25.
386. Tanaka Y, Mizuguchi M, Takahashi Y, et al. Human T-cell leukemia virus type-I Tax induces the expression of CD83 on T cells. *Retrovirology.* 2015;12:56.
387. Kreiser S, Eckhardt J, Kuhnt C, et al. Murine CD83-positive T cells mediate suppressor functions in vitro and in vivo. *Immunobiology.* 2015;220:270-9.
388. Iking-Konert C, Wagner C, Deneleh B, et al. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol.* 2002;130:501-8.
389. Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, et al. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med.* 2005;202:941-53.
390. von Rohrscheidt J, Petrozziello E, Nedjic J, et al. Thymic CD4 T cell selection requires attenuation of MHCII turnover in cortical epithelial cells through CD83. *J Exp Med.* 2016;213:1685-94.
391. Li Z, Ju X, Lee K, Clarke C, et al. CD83 is a new potential biomarker and therapeutic target for Hodgkin lymphoma. *Haematologica.* 2018;103:655-65.
392. Gao J, Tang T, Zhang B, Li G. A Prognostic Signature Based on Immunogenomic Profiling Offers Guidance for Esophageal Squamous Cell Cancer Treatment. *Front Oncol.* 2021;11:603634.
393. Wild AB, Krzyzak L, Peckert K, et al. CD83 orchestrates immunity toward self and non-self in dendritic cells. *JCI Insight.* 2019;4.
394. Fujimoto Y, Tu L, Miller AS, et al. CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell.* 2002;108:755-67.
395. Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, et al. CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. *J Immunol.* 2008;180:5890-7.

396. Chen L, Guan S, Zhou Q, Sheng S, Zhong F, Wang Q. Continuous expression of CD83 on activated human CD4⁺ T cells is correlated with their differentiation into induced regulatory T cells. *Mol Med Rep.* 2015;12:3309-14.
397. Liedtke K, Alter C, Günther A, et al. Endogenous CD83 Expression in CD4⁺ Conventional T Cells Controls Inflammatory Immune Responses. *J Immunol.* 2020;204:3217-26.
398. Lüthje K, Kretschmer B, Fleischer B, Breloer M. CD83 regulates splenic B cell maturation and peripheral B cell homeostasis. *Int Immunol.* 2008;20:949-60.
399. Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood.* 2012;120:2240-8.
400. Breloer M, Kretschmer B, Lüthje K, et al. CD83 is a regulator of murine B cell function in vivo. *European Journal of Immunology.* 2007;37:634-48.
401. Kretschmer B, Lüthje K, Guse AH, et al. CD83 modulates B cell function in vitro: increased IL-10 and reduced Ig secretion by CD83Tg B cells. *PLoS One.* 2007;2:e755.
402. Lechmann M, Shuman N, Wakeham A, Mak TW. The CD83 reporter mouse elucidates the activity of the CD83 promoter in B, T, and dendritic cell populations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:11887-92.
403. Kretschmer B, Kühl S, Fleischer B, Breloer M. Activated T cells induce rapid CD83 expression on B cells by engagement of CD40. *Immunol Lett.* 2011;136:221-7.
404. Surette FA, Guthmiller JJ, Li L, et al. Extrafollicular CD4 T cell-derived IL-10 functions rapidly and transiently to support anti-Plasmodium humoral immunity. *PLoS Pathog.* 2021;17:e1009288.
405. Uhde M, Kuehl S, Richardt U, Fleischer B, Osterloh A. Differential regulation of marginal zone and follicular B cell responses by CD83. *Int Immunol.* 2013;25:507-20.
406. McHeyzer-Williams LJ, Milpied PJ, Okitsu SL, McHeyzer-Williams MG. Switched-memory B cells remodel B cell receptors within secondary germinal centers. *Nat Immunol.* 2015;16:296-305.
407. García-Martínez LF, Appleby MW, Staehling-Hampton K, et al. A novel mutation in CD83 results in the development of a unique population of CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2004;173:2995-3001.
408. Kuwano Y, Prazma CM, Yazawa N, et al. CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells. *Int Immunol.* 2007;19:977-92.
409. Li M fei, Li Y xin, Sun L. CD83 is required for the induction of protective immunity by a DNA vaccine in a teleost model. *Dev Comp Immunol.* 2015;51:141-7.
410. Krzyzak L, Seitz C, Urbat A, et al. CD83 Modulates B Cell Activation and Germinal Center Responses. *J Immunol.* 2016;196:3581-94.
411. Tze LE, Horikawa K, Domaschew H, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med.* 2011;208:149-65.
412. Kretschmer B, Lüthje K, Schneider S, Fleischer B, Breloer M. Engagement of CD83 on B cells modulates B cell function in vivo. *J Immunol.* 2009;182:2827-34.
413. Kretschmer B. Anti-CD83 promotes IgG1 isotype switch in marginal zone B cells in response to TI-2 antigen. *Immunobiology.* 2015;220:964-75.

414. Wong KY, Baron R, Seldon TA, Jones ML, Rice AM, Munster DJ. CD83 Antibody Inhibits Human B Cell Responses to Antigen as well as Dendritic Cell-Mediated CD4 T Cell Responses. *J Immunol.* 2018;200:3383-96.
415. Cramer SO, Trumpfheller C, Mehlhoop U, Moré S, Fleischer B, von Bonin A. Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells. *Int Immunol.* 2000;12:1347-51.
416. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, et al. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;194:1813-21.
417. Hirano N, Butler MO, Xia Z, et al. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8⁺ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood.* 2006;107:1528-36.
418. Li Z, Ju X, Silveira PA, et al. CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2019;10:1312.
419. Stein MF, Blume K, Heilingloh CS, et al. CD83 and GRASP55 interact in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459:42-8.
420. Pinho MP, Migliori IK, Flatow EA, Barbuto JAM. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2014;95:755-62.
421. Horvatinovich JM, Grogan EW, Norris M, et al. Soluble CD83 Inhibits T Cell Activation by Binding to the TLR4/MD-2 Complex on CD14⁺ Monocytes. *J Immunol.* 2017;198:2286-301.
422. Wu YJ, Song YN, Geng XR, Ma F, Mo LH, Zhang XW, et al. Soluble CD83 alleviates experimental allergic rhinitis through modulating antigen-specific Th2 cell property. *Int J Biol Sci.* 2020;16:216-27.
423. Packhäuser KRH, Roman-Sosa G, Ehrhardt J, Krüger D, Zygmunt M, Muzzio DO. A Kinetic Study of CD83 Reveals an Upregulation and Higher Production of sCD83 in Lymphocytes from Pregnant Mice. *Front Immunol.* 2017;8:486.
424. Hock BD, Haring LF, Steinkasserer A, Taylor KG, Patton WN, McKenzie JL. The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res.* 2004;28:237-41.
425. Doebbeler M, Koenig C, Krzyzak L, et al. CD83 expression is essential for Treg cell differentiation and stability. *JCI Insight.* 2018;3:e99712.
426. Karampoor S, Zahednasab H, Etemadifar M, Keyvani H. The levels of soluble forms of CD21 and CD83 in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2018;320:11-4.
427. Kristensen AM, Stengaard-Pedersen K, Hetland ML, et al. Expression of soluble CD83 in plasma from early-stage rheumatoid arthritis patients is not modified by anti-TNF- α therapy. *Cytokine.* 2017;96:1-7.
428. Hock BD, O'Donnell JL, Taylor K, et al. Levels of the soluble forms of CD80, CD86, and CD83 are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens.* 2006;67:57-60.
429. Yokoyama-Kokuryo W, Yamazaki H, Takeuchi T, et al. Identification of molecules associated with response to abatacept in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2020;22:46.

430. Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Ławrynowicz U, Myśliwiec M, Myśliwska J. Putative loss of CD83 immunosuppressive activity in long-standing complication-free juvenile diabetic patients during disease progression. *Immunol Res.* 2019;67:70-6.
431. Song W, Li H, Jia B, et al. Soluble CD83 suppresses experimental food allergy via regulating aberrant T helper 2 responses. *Immunol Res.* 2020;68:141-51.
432. Lin W, Buscher K, Wang B, et al. Soluble CD83 Alleviates Experimental Autoimmune Uveitis by Inhibiting Filamentous Actin-Dependent Calcium Release in Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2018;9:1567.
433. Jin O, Kavikondala S, Sun L, et al. Systemic lupus erythematosus patients have increased number of circulating plasmacytoid dendritic cells, but decreased myeloid dendritic cells with deficient CD83 expression. *Lupus.* 2008;17:654-62.
434. Gerl V, Lischka A, Panne D, et al. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function. *Ann Rheum Dis.* juill 2010;69(7):1370-7.
435. Eckhardt J, Kreiser S, Döbbeler M, Nicolette C, DeBenedette MA, Tcherepanova IY, et al. Soluble CD83 ameliorates experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol.* 2014;7:1006-18.
436. Bates JM, Flanagan K, Mo L, et al. Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2015;8:414-28.
437. Mo LH, Luo XQ, Yang G, et al. Epithelial cell-derived CD83 restores immune tolerance in the airway mucosa by inducing regulatory T-cell differentiation. *Immunology.* 2021;163:310-22.
438. Magro CM, Segal JP, Crowson AN, Chadwick P. The phenotypic profile of dermatomyositis and lupus erythematosus: a comparative analysis. *J Cutan Pathol.* 2010;37:659-71.
439. He H, Bissonnette R, Wu J, et al. Tape strips detect distinct immune and barrier profiles in atopic dermatitis and psoriasis. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147:199-212.
440. Lin H, Liang S, Zhong Z, et al. Soluble CD83 inhibits human monocyte differentiation into dendritic cells in vitro. *Cell Immunol.* 2014;292:25-31.
441. Royzman D, Andreev D, Stich L, et al. Soluble CD83 Triggers Resolution of Arthritis and Sustained Inflammation Control in IDO Dependent Manner. *Front Immunol.* 2019;10:633.
442. Wilson J, Cullup H, Lourie R, Sheng Y, Palkova A, Radford KJ, et al. Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2009;206:387-98.
443. Seldon TA, Pryor R, Palkova A, et al. Immunosuppressive human anti-CD83 monoclonal antibody depletion of activated dendritic cells in transplantation. *Leukemia.* 2016;30:692-700.
444. Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med.* 2004;199:173-83.
445. Silveira PA, Kupresanin F, Romano A, et al. Anti-Mouse CD83 Monoclonal Antibody Targeting Mature Dendritic Cells Provides Protection Against Collagen Induced Arthritis. *Front Immunol.* 2022;13:784528.
446. Xu JF, Huang BJ, Yin H, et al. A limited course of soluble CD83 delays acute cellular rejection of MHC-mismatched mouse skin allografts. *Transpl Int.* 2007;20:266-76.
447. Lan Z, Lian D, Liu W, et al. Prevention of chronic renal allograft rejection by soluble CD83. *Transplantation.* 2010;90:1278-85.

448. Lan Z, Ge W, Arp J, et al. Induction of kidney allograft tolerance by soluble CD83 associated with prevalence of tolerogenic dendritic cells and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Transplantation*. 2010;90:1286-93.
449. Bock F, Rössner S, Onderka J, et al. Topical application of soluble CD83 induces IDO-mediated immune modulation, increases Foxp3⁺ T cells, and prolongs allogeneic corneal graft survival. *J Immunol*. 2013;191:1965-75.
450. Peckert-Maier K, Schönberg A, Wild AB, et al. Pre-incubation of corneal donor tissue with sCD83 improves graft survival via the induction of alternatively activated macrophages and tolerogenic dendritic cells. *Am J Transplant*. 2022;22:438-54.
451. Ge W, Arp J, Lian D, et al. Immunosuppression involving soluble CD83 induces tolerogenic dendritic cells that prevent cardiac allograft rejection. *Transplantation*. 2010;90:1145-56.
452. Zinser E, Lechmann M, Golka A, Lutz MB, Steinkasserer A. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *J Exp Med*. 2004;200:345-51.
453. Lin W, Man X, Li P, et al. NK cells are negatively regulated by sCD83 in experimental autoimmune uveitis. *Sci Rep*. 2017;7:12895.
454. Starke C, Steinkasserer A, Voll RE, Zinser E. Soluble human CD83 ameliorates lupus in NZB/W F1 mice. *Immunobiology*. 2013;218:1411-5.
455. Zacca ER, Amezcua Vesely MC, et al. B cells from Patients with Rheumatoid Arthritis Show Conserved CD39-Mediated Regulatory Function and increased CD39 Expression After Positive Response to Therapy. *J Mol Biol*. 2021;433:166687.
456. Horisberger A, Humbel M, Fluder N, et al. Measurement of circulating CD21-CD27- B lymphocytes in SLE patients is associated with disease activity independently of conventional serological biomarkers. *Sci Rep*. 2022;12:9189.
457. Dauby N, Kummert C, Lecomte S, et al. Primary human cytomegalovirus infection induces the expansion of virus-specific activated and atypical memory B cells. *J Infect Dis*. 2014;210:1275-85.
458. Bendris N, Schmid SL. Endocytosis, metastasis and beyond: Multiple facets of SNX9. *Trends Cell Biol*. 2017;27:189-200.
459. Hahn M, Bürckert JP, Luttenberger CA, et al. Aberrant splicing of the tumor suppressor CYLD promotes the development of chronic lymphocytic leukemia via sustained NF- κ B signaling. *Leukemia*. 2018;32:72-82.
460. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*. 2003;424:801-5.
461. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tsihritzis T, et al. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature*. 2003;424:793-6.
462. Grönroos T, Teppo S, Mehtonen J, et al. Overexpression of PTP4A3 in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2017;54:1-6.
463. McLellan AD, Heiser A, Sorg RV, Fearnley DB, Hart DN. Dermal dendritic cells associated with T lymphocytes in normal human skin display an activated phenotype. *J Invest Dermatol*. 1998;111:841-9.

464. Komine M, Karakawa M, Takekoshi T, et al. Early inflammatory changes in the « perilesional skin » of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? *J Invest Dermatol.* 2007;127(8):1915-22.
465. Shrestha B, Walton K, Reff J, et al. Human CD83-targeted chimeric antigen receptor T cells prevent and treat graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* 2020;130:4652-62.
466. Baeuerle PA, Wesche H. T-cell-engaging antibodies for the treatment of solid tumors: challenges and opportunities. *Curr Opin Oncol.* 2022;34:552-8.
467. Hörner S, Moustafa-Oglou M, Teppert K, et al. IgG-Based Bispecific Anti-CD95 Antibodies for the Treatment of B Cell-Derived Malignancies and Autoimmune Diseases. *Cancers (Basel).* 2022;14:3941.
468. Barkhordari A, Mahnam K, Mirmohammad-Sadeghi H. Designing a new bispecific tandem single-chain variable fragment antibody against tumor necrosis factor- α and interleukin-23 using in silico studies for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Mol Model.* 2020;26:225.

Le pemphigus est un groupe hétérogène de maladies bulleuses auto-immunes intra-épithéliales où les lymphocytes B produisent des auto-anticorps pathogènes directement responsables des lésions bulleuses et érosives, cutanées et muqueuses. Les thérapies ciblées déplaçant les lymphocytes B (LB) telles que les anticorps monoclonaux anti-CD20 (RTX) ont permis d'améliorer grandement le pronostic des patients. Cependant, certains sont résistants à ces traitements ou rechutent à distance justifiant l'intérêt de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer l'arsenal thérapeutique du pemphigus. Les résultats de ce travail suggèrent l'implication de CD83 dans l'activité du pemphigus. CD83 est une protéine de la superfamille des immunoglobulines existant sous une forme membranaire, exprimée par un large panel de cellules immunitaires activées, et sous une forme soluble. CD83 joue un rôle particulièrement important dans l'orchestration des réponses immunitaires et dans la régulation de l'auto-immunité. CD83 est notamment impliqué dans la maturation des LB. Nos travaux mettent en évidence que les LB de patients ayant un pemphigus actif ont une transcription plus importante du gène de CD83 en comparaison aux donneurs sains, notamment les LB Dsg3+-spécifiques lors de l'étude par single-cell RNA sequencing. Cette augmentation de transcription est associée à une augmentation de l'expression de CD83 à la membrane des LB et à une baisse du taux de CD83 soluble sérique, qui est corrélé négativement au taux d'anticorps anti-Dsg3, chez les patients ayant un pemphigus actif en comparaison aux donneurs sains et aux patients en rémission. Les LB présents au sein de structures ectopiques lymphocytaires des tissus lésés de pemphigus expriment CD83. En culture de PBMC de pemphigus actif allostimulées ou non stimulées, le traitement par anticorps anti-CD83 est responsable d'une surexpression de CD86 par les LB, d'une augmentation de la production de IgG, d'une plus grande quantité d'anticorps anti-Dsg3, associé à une baisse du CD83 soluble. L'ensemble de ces résultats suggère ainsi un potentiel intérêt thérapeutique à cibler CD83 dans le pemphigus. Alors que de tels traitements sont déjà en développement dans les hémopathies, le rejet de greffe ou des maladies inflammatoires chroniques, un traitement déplaçant les LB CD83+ ou administrant du CD83 soluble pourrait permettre d'améliorer la régulation de l'auto-immunité dans le pemphigus.

Pemphigus is a heterogeneous group of autoimmune intraepithelial bullous diseases in which B cells produce pathogenic autoantibodies that are directly responsible for bullous and erosive skin and mucosal lesions. Targeted therapies that deplete B lymphocytes (LB) such as anti-CD20 monoclonal antibodies (RTX) have greatly improved the prognosis of patients. However, some patients are resistant to these treatments or relapse at a distance, justifying the interest in searching for new therapeutic targets to improve the therapeutic arsenal of pemphigus. The results of this work suggest the involvement of CD83 in the activity of pemphigus. CD83 is a protein of the immunoglobulin superfamily that exists in a membrane form, expressed by a wide range of activated immune cells, and in a soluble form. CD83 plays a particularly important role in the orchestration of immune responses and in the regulation of autoimmunity. In particular, CD83 participates in the maturation of B-cells. Our work shows that LBs from patients with active pemphigus have a higher transcription of the CD83 gene compared to healthy donors, especially Dsg3+-specific B-cells when studied by single-cell RNA sequencing. This increase in transcription is associated with an increase in membrane CD83 expression in LB and a decrease in serum soluble CD83 levels, which correlate negatively with anti-Dsg3 antibody levels, in patients with active pemphigus compared to healthy donors and patients in remission. LB within lymphocytic ectopic structures of inflamed pemphigus tissue express CD83. In cultured allostimulated or unstimulated active pemphigus PBMCs, treatment with anti-CD83 antibodies resulted in overexpression of CD86 by B-cells, increased IgG production, increased anti-Dsg3 antibodies, and decreased soluble CD83. Together, these results suggest a potential therapeutic interest in targeting CD83 in pemphigus. While such treatments are already in development for hemopathies, graft rejection or chronic inflammatory diseases, a treatment that depletes CD83+ B-cells or administers soluble CD83 might improve the regulation of autoimmunity in pemphigus.

Discipline : Biologie, mention Biologie moléculaire et cellulaire.

Mots clés : pemphigus, lymphocytes B, CD83, CD86, anticorps anti-Dsg3, anticorps anti-CD83, single cell RNA sequencing

UMR INSERM 1125, Université Sorbonne Paris Nord, 1 Rue de Chablis 93017 BOBIGNY