

Université de Montréal

**Suivi immunologique longitudinal des patients atteints de pemphigus  
inclus dans l'étude RITUX3**

*Par*

Alexandre Lemieux

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences Biomédicales, option Médecine Expérimentale

Décembre 2021

© Alexandre Lemieux, 2021



Université de Montréal

Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Suivi immunologique longitudinal des patients atteints de pemphigus  
inclus dans l'étude RITUX3**

*Présenté par*

**Alexandre Lemieux**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Dre Catherine Maari**  
Président-rapporteur

**Dr Élie Haddad**  
Directeur de recherche

**Pr Pascal Joly**  
Codirecteur de recherche

**Dre Alexandra Mereniuk**  
Membre du jury



## Résumé

Le pemphigus est une maladie bulleuse auto-immune sévère causée par des auto-anticorps (Ac) ciblant la desmogléine (Dsg) 1 et/ou 3, principalement de la sous-classe IgG4. Certains Ac non spécifiques à la Dsg ont été décrits, comme la desmocolline 3 (Dsc3), mais leur pertinence est peu connue. Suite à l'étude RITUX3 en 2017, le traitement de première intention du pemphigus est le rituximab (RTX). Ce projet comprend trois volets qui s'inscrivent dans la caractérisation immunologique des patients inclus dans l'étude RITUX3, visant à mieux comprendre la pathogénèse et la prise en charge du pemphigus. Nous avons d'abord étudié la diversité isotypique des Ac anti-Dsg3. Nous avons démontré qu'un nombre d'isotypes plus élevé mène à un risque de rechute, particulièrement l'IgG3 anti-Dsg3 qui était détecté chez 71% des rechuteurs, comparativement à 12% des patients en rémission complète. Ensuite, nous avons étudié la prévalence et la pathogénicité *in vitro* des Ac anti-Dsc3. Ils étaient détectés chez 21% des patients, soit significativement plus qu'une population de donneurs sains. L'isotype principal était l'IgA, et leur pathogénicité *in vitro* a été démontrée à partir de sérums de patients et de souris immunisées. La présence de ces Ac permettait d'expliquer une bonne proportion des cas de discordance entre le profil sérologique d'anti-Dsg et le phénotype clinique des patients. Finalement, nous avons étudié la prévalence d'Ac anti-rituximab (ARA) chez les patients traités par RTX. Ils étaient détectés chez 31% des patients, mais n'affectaient pas l'atteinte d'une rémission complète et ne seraient pas une contre-indication à des perfusions subséquentes. Par contre, un petit groupe de patients qui présentaient des ARA fonctionnels étaient à risque de rechute.

**Mots-clés :** dermatologie, pemphigus, auto-immunité, auto-anticorps, desmogléine 3, desmocolline 3, pathogénicité, rituximab, anticorps anti-rituximab, rechute



## Abstract

Pemphigus is a severe auto-immune blistering disease caused by auto-antibodies (Abs) targeting desmoglein (Dsg) 1 and/or 3, mainly of the IgG4 subclass. Several Abs non-specific to the Dsg have been described, including desmocollin (Dsc) 3, but their relevance is not well known. Since the RITUX3 clinical trial in 2017, rituximab (RTX) is recommended as the first-line treatment for moderate-to-severe pemphigus. This project consists of three parts with the main goal of immunologically characterizing patients who were included in the RITUX3 trial, to allow a better understanding of the pathogenesis and treatment of pemphigus. First, we studied the diversity of IgG anti-Dsg3 subclasses. A higher number of subclasses was associated with a significant risk of relapse, especially with IgG3 anti-Dsg3 detected in 71% of relapsing patients, compared to 12% of patients in complete remission. Then, we studied the prevalence and pathogenicity of anti-Dsc3 Abs. They were detected in 21% of patients, significantly more than healthy donors. The main isotype was IgA, and their *in vitro* pathogenicity was demonstrated with sera from patients and immunized mice. Their presence explained a good proportion of cases who presented discrepancies between the clinical phenotype and the serological profile of anti-Dsg Abs. Finally, we studied the prevalence of anti-RTX Abs (ARA) in patients treated with RTX. They were detected in 31% of patients but did not affect the rate of complete remission and are not a contra-indication to receive subsequent perfusions. However, a small group of patients who presented functional ARA were at risk of relapse.

**Keywords:** dermatology, pemphigus, auto-immunity, auto-antibodies, desmoglein 3, desmocollin 3, pathogenicity, rituximab, anti-rituximab antibodies, relapse





# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>15</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>17</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>21</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>23</b>
<b>CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....</b>	<b>25</b>
<b>1- Anatomie et structure de l'épiderme.....</b>	<b>25</b>
1.1 Les desmosomes.....	25
1.1.1 Structure du desmosome.....	26
1.1.2 Les cadhérines desmosomales.....	26
1.1.3 La formation des liaisons interkératinocytaires.....	28
1.1.4 L'expression épidermique des cadhérines desmosomales.....	29
<b>2- Le pemphigus.....</b>	<b>30</b>
2.1 Épidémiologie.....	30
2.2 Classification du pemphigus.....	31
2.2.1 Pemphigus vulgaire.....	31
2.2.2 Pemphigus foliacé.....	33
2.3 Diagnostic du pemphigus.....	34
2.3.1 Méthodes et critères diagnostics.....	34
2.3.1.1 Histopathologie.....	34
2.3.1.2 Immunofluorescence directe.....	34
2.3.1.3 Tests sérologiques.....	34
2.3.2 Évaluation de la sévérité clinique.....	35
<b>3- Physiopathologie du pemphigus.....</b>	<b>35</b>
3.1 Le développement de l'auto-immunité.....	36

3.2 Les auto-anticorps.....	39
3.2.1 Les immunoglobulines.....	39
3.2.2 Les isotypes d’immunoglobulines anti-Dsg chez les patients pemphigus .....	40
3.2.3 Mécanisme de l’acantholyse par les auto-anticorps anti-desmogléine .....	41
3.3 La théorie de compensation de la desmogléine .....	43
3.3.1 Limites de la théorie de compensation de la desmogléine.....	44
3.4 Les auto-anticorps non spécifiques à la desmogléine .....	46
3.4.1 La desmocolline 3 .....	46
<b>4. Traitement du pemphigus .....</b>	<b>49</b>
4.1 Le rituximab.....	50
4.1.1 Utilisation du rituximab dans le traitement du pemphigus.....	51
4.1.2 Mécanisme d’action du rituximab .....	52
4.1.3 Résistance au rituximab.....	54
4.1.3.1 Les anticorps anti-rituximab .....	54
4.1.3.2 Polymorphisme du FCGR3A .....	55
<b>CHAPITRE 2 – OBJECTIFS DE TRAVAIL.....</b>	<b>56</b>
<b>PARTIE 1 : Caractérisation des sous-classes d’immunoglobulines anti-desmogléine 3 chez les patients atteints de pemphigus .....</b>	<b>56</b>
<b>PARTIE 2 : Caractérisation des auto-anticorps anti-desmocolline 3 chez les patients atteints de pemphigus .....</b>	<b>56</b>
<b>PARTIE 3 : Caractérisation des anticorps anti-rituximab et leur impact dans le traitement des patients atteints de pemphigus .....</b>	<b>57</b>
<b>CHAPITRE 3 – ARTICLE 1 .....</b>	<b>58</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>58</b>
Nouveautés et messages-clés.....	58
Contribution de l’étudiant.....	59
<b>The Diversity of Serum Anti-DSG3 IgG Subclasses Has a Major Impact On Pemphigus Activity and May Be Predictive of Relapses After Treatment With Rituximab.....</b>	<b>60</b>
<b>CHAPITRE 4 – ARTICLE 2 .....</b>	<b>83</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>83</b>
Nouveautés et messages-clés.....	83
Contribution de l’étudiant.....	84

<b>Prevalence and Pathogenic Activity of Anti-Desmocollin 3 Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus .....</b>	<b>85</b>
<b>CHAPITRE 5 – ARTICLE 3 .....</b>	<b>101</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>101</b>
Nouveautés et messages-clés.....	101
Contribution de l'étudiant.....	102
<b>Clinical Relevance and Biological Effects of Anti-rituximab Antibodies in Patients With Pemphigus.....</b>	<b>103</b>
<b>CHAPITRE 6 – DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>118</b>
<b>Article 1 : Diversité des sous-classes d'IgG anti-Dsg3 et l'impact sur l'activité de la maladie et la survenue de rechute .....</b>	<b>118</b>
<b>Article 2 : Prévalence et pathogénicité des Ac anti-Dsc3 intracellulaires .....</b>	<b>121</b>
<b>Article 3 : Pertinence clinique et effets biologiques des ARA chez les patients traités par RTX.....</b>	<b>126</b>
<b>CHAPITRE 7 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>130</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>135</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>147</b>
<b>Annexe 1 : Brevet international déposé le 26 août 2021 .....</b>	<b>147</b>
METHODS FOR DETECTING THE PRESENCE OF PEMPHIGUS-SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN A SAMPLE .....	147



**Liste des tableaux**

Tableau 1. – Classification du pemphigus ..... 31



## Liste des figures

Figure 1. – Structure du desmosome vue en microscopie électronique et représentation schématique (Jonhson <i>et al.</i> , 2014).....	27
Figure 2. – Organisation génomique et moléculaire des cadhérines desmosomales (adaptée de Getsios <i>et al.</i> , 2004) .....	29
Figure 3. – Expression des isoformes des cadhérines desmosomales dans l'épiderme (adaptée de Green et Simpson, 2007).....	30
Figure 4. – Présentation anatomo-clinique du pemphigus vulgaire (adaptée de Schmidt <i>et al.</i> , 2019; Bologna <i>et al.</i> , 5 <sup>e</sup> édition, 2017).....	32
Figure 5. – Présentation anatomo-clinique du pemphigus foliacé (adaptée de Schmidt <i>et al.</i> , 2019; Bologna <i>et al.</i> , 5 <sup>e</sup> édition, 2017).....	33
Figure 6. – Représentation du complexe majeur d'histocompatibilité (gracieuseté de Marie-Laure Golinski, 2014) .....	38
Figure 7. – Représentation schématique de la théorie de compensation de la desmogléine (adaptée de Hammers <i>et al.</i> , 2016).....	44
Figure 8. – Structure moléculaire de la desmocolline 3 (adaptée de Getsios <i>et al.</i> , 2004).....	47
Figure 9. – Production du précurseur et de la forme mature d'une cadhérine desmosomale (adaptée de Yokouchi <i>et al.</i> , 2009).....	48
Figure 10. – Mécanismes d'action du rituximab (adaptée de Maloney <i>et al.</i> , 2012).....	53





## Liste des sigles et abréviations

Ac	Anticorps
Acm	Anticorps monoclonal
ADCC	Cytotoxicité dépendante des anticorps
ALBIA	<i>Addressable Laser Bead Immunoassay</i>
ARA	Anticorps anti-rituximab
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CB	Couche basale
CC	Couche cornée
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément
CDR	<i>Complementary determining region</i>
CE	Couche épineuse
CG	Couche granuleuse
CHRM3	Récepteur à l'acétylcholine muscarinique type 3
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CS	Corticostéroïdes
DP	Desmoplakine
Dsc	Desmocolline
Dsg	Desmogéine
EA	Domaine d'ancrage extracellulaire
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	Fragment cristallisable
FcRn	Transporteur Fc néonatal
FcγR	Récepteur Fcγ
HACA	Anticorps anti-chimérique humain
HLA	Antigène des leucocytes humains

IA	Domaine d'ancrage intracellulaire
ICS	Segment de cadhérine intracellulaire
IFD	Immunofluorescence directe
IFI	Immunofluorescence indirecte
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IPL	Segment de liaison intracellulaire riche en proline
KC	Kératinocytes
LB	Lymphocytes B
LED	Lupus érythémateux disséminé
LT	Lymphocytes T
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
NK	<i>Natural killer</i>
PAR	Polyarthrite rhumatoïde
PB	Pemphigoïde bulleuse
PDAI	<i>Pemphigus Disease Area Index</i>
PF	Pemphigus foliacé
PG	Plakoglobine
PKP	Plakophiline
PPN	Pemphigus paranéoplasique
PV	Pemphigus vulgaire
RC	Rémission complète
RI	Rémission incomplète
RTX	Rituximab
SPCA1	Transporteur de Ca <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> ATPase type 2C1
TCD	Théorie de compensation de la desmogléine
TM	Domaine transmembranaire
UA	Unité arbitraire
UI	Unité internationale

*À Lily et Mamond; des grands-parents  
en or qui me supportent dans mes projets  
les plus fous depuis le tout début*



## Remerciements

Je suis parvenu à réaliser ce projet grâce au support de plusieurs mentors et collègues, et ce, malgré le contexte socio-sanitaire historique que nous vivons avec la COVID-19. Je tiens particulièrement à remercier :

**Pr Pascal Joly** pour m'avoir accueilli dans son service et son laboratoire à Rouen, en France. C'est une opportunité qui m'a beaucoup apporté, tant sur le plan professionnel que personnel. Je suis revenu au Québec avec un bagage de connaissances qui me sera indispensable et forge désormais les piliers de ma carrière en tant que dermatologue. Mes apprentissages ont grandement stimulé mon intérêt grandissant pour la recherche ;

**Dr Élie Haddad** pour avoir accepté de me superviser au cours de cette maîtrise et de m'avoir offert son support. Merci d'encourager la relève; cette maîtrise et mon année en France m'ont ouvert une multitude d'opportunités et de beaux projets sont encore à venir ;

**Dr Benoît Côté, Dre Mélissa Saber et Dre Isabelle Marcil** pour leur appui indispensable. Le programme de dermatologie de l'Université de Montréal a été un modèle dans son support pour me permettre de réaliser cette maîtrise au cours de ma résidence. Merci de m'avoir soutenu dans ce projet, ainsi que tout le service de dermatologie du CHUM ;

**Marie-Laure Golinski** pour son enseignement et son encadrement exemplaire pendant mon séjour au laboratoire, et particulièrement son support tout au long du confinement en France. **Maud Maho-Vaillant** qui a été une formidable collègue de bureau lors de mon année au laboratoire et auprès de qui j'ai beaucoup appris, ainsi que **Vivien Hébert**. Au plaisir de vous revoir lors de mes visites en France, et surtout, de collaborer avec vous dans le futur !

Je remercie aussi les membres du jury de mon mémoire d'avoir accepté de réviser et d'évaluer mon travail. Et finalement, le fond de recherche Lise Bachand en dermatologie et la Société Française de Dermatologie pour leur soutien financier.



## Avant-propos

Le pemphigus, tiré du mot grec *pemphix* qui signifie bulle, est une maladie bulleuse auto-immune sévère et potentiellement mortelle causée par la production d'auto-anticorps ciblant des protéines de l'adhésion inter-kératinocytaire, soit la desmogléine 1 et/ou 3. Au cours de ma résidence en dermatologie, j'ai été en contact avec plusieurs de ces patients via la clinique spécialisée en bulloses auto-immunes au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), et j'ai développé un fort intérêt pour ces pathologies qui touchent à la dermatologie et à l'immunologie. Ce travail de maîtrise a été une occasion pour moi de m'intéresser davantage à ce domaine de la dermatologie et de développer une expertise en recherche et clinique qui me sera utile pour le reste de ma carrière.

Mon travail de maîtrise s'inscrit dans un grand projet de suivi des patients atteints de pemphigus ayant été inclus dans l'étude RITUX3 publiée dans le *Lancet* en 2017 par l'équipe du Pr Pascal Joly. Cette étude clinique prospective multi-centrique avait pour but de comparer l'efficacité d'un traitement avec rituximab combiné à une courte corticothérapie systémique au traitement standard, soit une corticothérapie systémique de longue durée. La nette supériorité du rituximab a bien été démontrée avec 89% de rémission complète à 2 ans, *versus* 34% parmi les patients traités par corticothérapie seule. Ceci a mené à l'approbation du rituximab comme agent de première ligne dans le traitement du pemphigus vulgaire modéré à sévère par la *Food and Drug Administration*, ainsi que l'Agence Européenne de Médecine.

Le présent mémoire débutera par une introduction qui abordera les principes de base de l'anatomie épidermique, la présentation clinique du pemphigus, sa pathogénèse et un bref survol des traitements, particulièrement sur l'utilisation du rituximab.

Ensuite, les 3 articles inclus seront présentés.

1. Le **premier article** (article original) abordera la diversité isotypique des anticorps anti-desmogléine 3 et leur impact dans la sévérité et la survenue des rechutes chez les patients atteints de pemphigus. La desmogléine 3 représente la principale cible antigénique connue dans la pathogénèse du pemphigus à ce jour.
2. Le **deuxième article** (lettre de recherche) abordera la caractérisation des anticorps anti-desmocolline 3 et l'étude de leur pathogénicité. La desmocolline 3 représente une cible antigénique moins bien défini dans la pathogénèse du pemphigus.
3. Le **troisième article** (article court) abordera le développement des anticorps anti-rituximab et leur impact clinico-biologique dans le traitement des patients atteints de pemphigus.

Finalement, une discussion générale sur chacun des trois articles sera présentée en mettant l'emphase sur l'importance et l'impact clinique potentiel de ces travaux, avec une conclusion et des perspectives futures faisant suite aux résultats obtenus.



# CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

## 1- Anatomie et structure de l'épiderme

L'épiderme est la mince couche externe de la peau issue de l'ectoderme et se compose de kératinocytes (KC), de mélanocytes, de cellules de Langerhans et de cellules de Merkel. Les KC représentent la grande majorité des cellules de l'épiderme. Ils sont issus de la différenciation de cellules souches localisées à la membrane basale, et migrent ensuite à travers les 4 couches épidermiques [1]. Ces couches, à partir de la surface, sont la couche cornée (CC), la couche granuleuse (CG), la couche épineuse (CE) et la couche basale (CB) [2]. Les KC de chaque couche ont des caractéristiques morphologiques et des marqueurs distincts qui sont associés à leurs stades de différenciation [3]. Leur principale fonction est la synthèse de kératine, une protéine hétérogène qui s'organise en faisceaux pour former les filaments intermédiaires qui assurent le maintien de leur structure cellulaire, conjointement avec les microfilaments d'actine.

La cohésion des KC est assurée par 4 types de jonctions intercellulaires : les jonctions communicantes, les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Celles-ci sont dynamiques et évoluent à travers les couches de l'épiderme. Les jonctions communicantes forment des canaux qui facilitent les échanges intercellulaires d'ions, de petites molécules et d'influx électriques [4]. Les jonctions serrées, localisées dans les régions apicales, forment une barrière physique efficace au passage de l'eau et de molécules entre les régions apicales et basales. Finalement, les jonctions adhérentes et les desmosomes interagissent pour maintenir l'intégrité de la peau en assurant la cohésion interkératinocytaire. Les jonctions adhérentes se forment généralement plus rapidement, mais sont plus faibles que les desmosomes.

### 1.1 Les desmosomes

Les desmosomes sont des structures d'adhésion intercellulaire principalement retrouvés dans les tissus cutanés et cardiaques. Dans la peau, ce sont les principaux responsables de la cohésion entre les KC en assurant l'ancrage des filaments intermédiaires de kératine, et sont aussi impliqués dans la morphogénèse et la différenciation cellulaire [5, 6]. Leur rôle primordial

dans cette cohésion est mis en évidence par différentes pathologies héréditaires, auto-immunes ou infectieuses qui affectent leurs structures et fragilisent ainsi les tissus. En effet, en plus des auto-anticorps (Ac) que nous aborderons dans ce mémoire, des agents infectieux, comme le *Staphylococcus aureus*, peuvent produire des toxines exfoliatives comme l'ETA (*exfoliative toxin A*) qui induisent un décollement superficiel de la peau en clivant la desmogléine (Dsg) 1. Ce décollement est similaire à celui observé chez les patients atteints de pemphigus foliacé (PF) chez qui les Ac ciblent la Dsg1.

### **1.1.1 Structure du desmosome**

Trois familles de protéines forment la structure des desmosomes : les cadhérines desmosomales (Dsg et desmocolline (Dsc)), les protéines de la famille *Armadillo* (plakoglobine (PG) et plakophiline (PKP)) et une plakine (desmoplakine (DP)) [2]. La microscopie électronique a permis de distinguer les structures présentes dans la desmoglie, soit l'espace intercellulaire où se lient les Dsg et les Dsc de KC adjacents, et la plaque desmosomale intracellulaire, soit le lieu où s'attachent les filaments intermédiaires de kératine.

Les cadhérines desmosomales assurent la fonction d'adhésion au niveau de la desmoglie avec leur portion extracellulaire, et leur portion intracellulaire cytoplasmique se lie à la PG et à la PKP dans la plaque desmosomale. C'est ensuite la DP qui assure le lien entre les filaments intermédiaires du cytosquelette, dont la kératine, et la PG et la PKP (voir Figure 1) [7]. Les desmosomes permettent donc d'établir les liens entre les filaments intermédiaires des KC adjacents et assurent ainsi le support et la cohésion de l'épiderme.

### **1.1.2 Les cadhérines desmosomales**

Les cadhérines se divisent en 2 groupes : les cadhérines classiques qui forment les jonctions adhérentes, comprenant la E-cadhérine, N-cadhérine et P-cadhérine, et les cadhérines desmosomales. Les cadhérines desmosomales sont des glycoprotéines transmembranaires  $Ca^{2+}$ -dépendantes et sont encodées sur le chromosome 18q12.1. Elles sont initialement synthétisées

en précurseurs inactifs qui sont clivés par une proprotéine convertase dans leur forme mature. Elles comprennent deux types : les Dsg et les Dsc [8]. Les Dsc comprennent 3 isoformes, soit la Dsc1, la Dsc2 et la Dsc3 (nous reviendrons sur la Dsc3 et sa structure à la section 3.4.1). Les Dsg comprennent quant à elles 4 isoformes, soit la Dsg1, la Dsg2, la Dsg3 et la Dsg4, dont l'expression varie en fonction des tissus. Toutes les isoformes ont une organisation moléculaire similaire et partagent au moins 30% de similitude dans leurs séquences [5, 9]

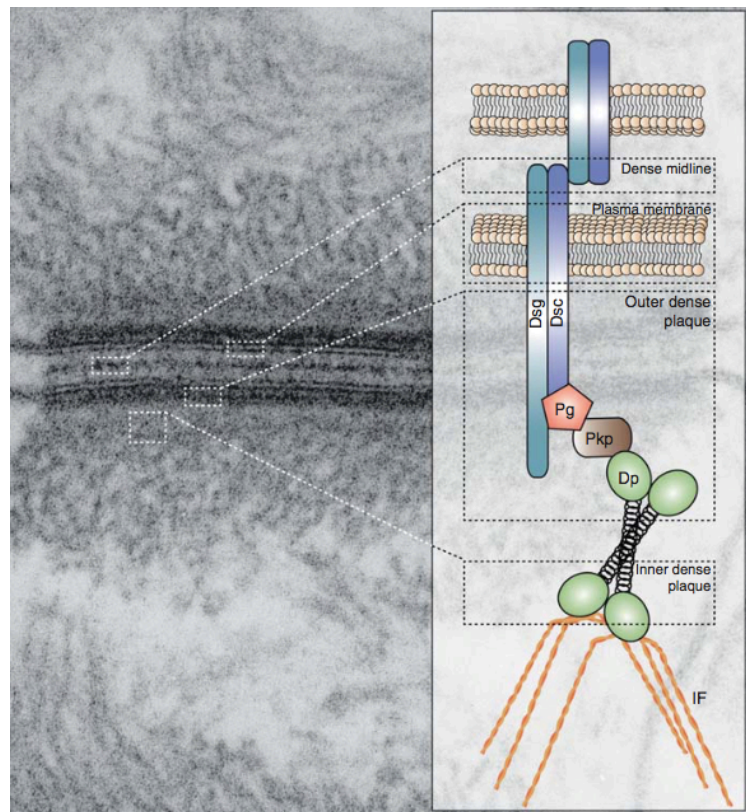


Figure 1. – Structure du desmosome vue en microscopie électronique et représentation schématique (Jonhson *et al.*, 2014)

Les Dsg sont formées de cinq domaines extracellulaires (EC1 à EC5 – le domaine EC5 étant parfois nommé le domaine d'ancrage extracellulaire (EA)), un domaine transmembranaire (TM), un domaine d'ancrage intracellulaire (IA), un segment de cadhérine intracellulaire (ICS) et des segments cytoplasmiques. Ces derniers se composent d'un segment de liaison

intracellulaire riche en proline (IPL), d'un nombre variable de domaines d'unité répété (RUD) et d'un domaine terminal spécifique à la Dsg (DTD) [2] (voir Figure 2). Les domaines extracellulaires sont chacun composés d'une séquence d'environ 100-110 acides aminés et comprennent des séquences fixes destinées à la liaison des ions de  $\text{Ca}^{2+}$  [5]. La structure rigide et conformationnelle des cadhérines desmosomales est essentielle à leurs interactions *cis* et *trans*, homophile et hétérophile, au sein de la desmogleine. Cette conformation rigide est en grande partie maintenue par la présence essentielle d'ions de  $\text{Ca}^{2+}$  [2]. Ces cadhérines présentent aussi un résidu de tryptophane à l'extrémité EC1 N-terminale qui est un site de liaison important pour la cohésion intercellulaire [10, 11]. Plusieurs exemples démontrent bien que le métabolisme cellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est primordial pour le maintien de la cohésion intercellulaire. Les mutations dans le gène *ATP2C1*, qui encode une pompe intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  localisée dans la paroi de l'appareil de Golgi des KC, peuvent induire une acantholyse dans la maladie de Hailey-Hailey, une manifestation commune avec les pemphigus vulgaire (PV) et PF [12]. Aussi, un inhibiteur de la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, l'ouabaïne, peut déréguler le niveau de calcium intracellulaire et affecter l'assemblage des desmosomes *in vitro* [13].

### 1.1.3 La formation des liaisons interkératinocytaires

La cohésion cellulaire est donc en grande partie assurée par les liaisons entre les cadhérines desmosomales au niveau de la desmogleine. Le principal site d'interaction de chaque Dsg et Dsc est localisé à l'extrémité N-terminale et implique majoritairement l'EC1 et l'EC2 [5]. Ce premier segment comporte une région de reconnaissance d'adhésion cellulaire (CAR) responsable de cette interaction (voir Figure 2). Toutefois, l'expression d'une seule des cadhérines desmosomales (Dsg ou Dsc) ne parvient pas à produire une forte adhésion sur des cellules non adhérentes *in vitro* [14, 15]. En effet, la présence des deux protéines sur deux cellules distinctes est essentielle à la formation de ces liens [16], et elles peuvent chacune interagir en formant des liens *cis* ou *trans*, hétérophiles ou homophiles [7]. Toutefois, les liaisons seraient principalement opérées par des interactions *trans* et *cis* hétérophiles plutôt qu'homophiles [2, 15, 17, 18]. Ainsi, l'intégrité de la Dsc, en plus de la Dsg, serait essentielle au maintien de la cohésion cellulaire.

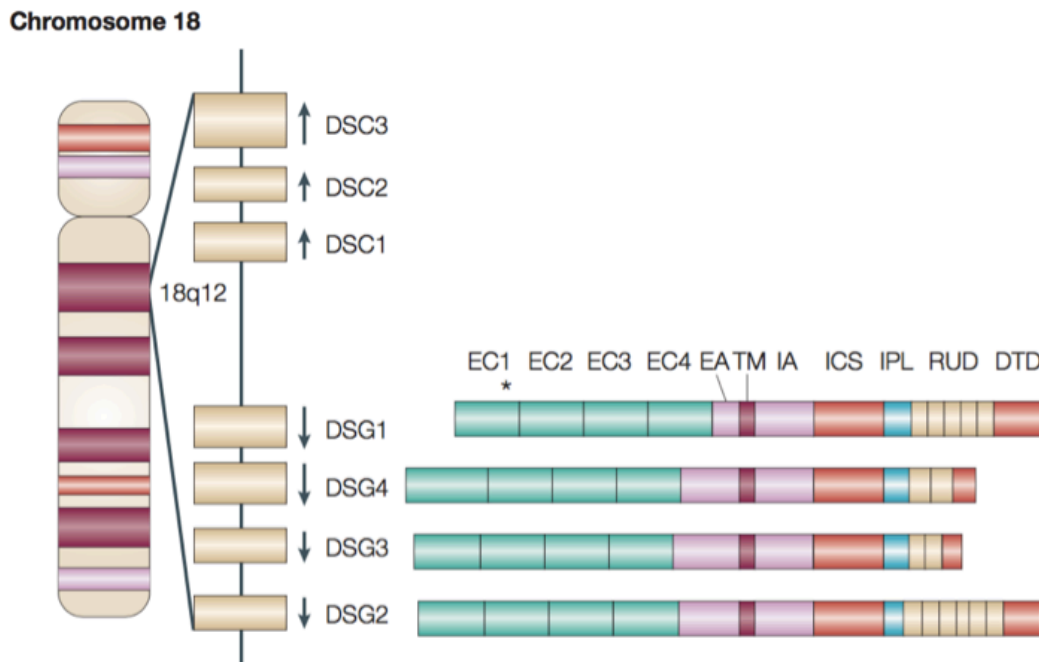


Figure 2. – Organisation génomique et moléculaire des cadhérines desmosomales (adaptée de Getsios *et al.*, 2004)

#### 1.1.4 L'expression épidermique des cadhérines desmosomales

Comme mentionné, les jonctions épidermiques, dont les desmosomes, sont des structures dynamiques qui évoluent en fonction de la stratification épidermique. Chaque cadhérine desmosomale ayant plusieurs isoformes, l'expression de celles-ci diffère selon le niveau de différenciation épithéliale. Ainsi, la Dsg1 et la Dsc1 sont présentes en grande partie dans les couches superficielles de l'épiderme, tandis que la Dsg3 et la Dsc3 sont principalement exprimées dans les couches profondes (voir Figure 3) [7, 19]. Les phénotypes cliniques et histologiques des patients atteints de pemphigus varient donc en fonction des cibles précises de leurs Ac (nous y reviendrons à la section 3.3). En plus de leurs fonctions adhésives, les composants desmosomaux régulent la signalisation intracellulaire. Ces protéines participent activement à la morphogénèse épithéliale et sont des cibles dans la différenciation des KC. Les événements post-traductionnels, comme l'activité kinase/phosphatase et les traitements protéolytiques, mais également le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  et la liaison croisée avec les jonctions adhérentes, sont impliqués dans l'assemblage et le désassemblage des desmosomes [2, 7].

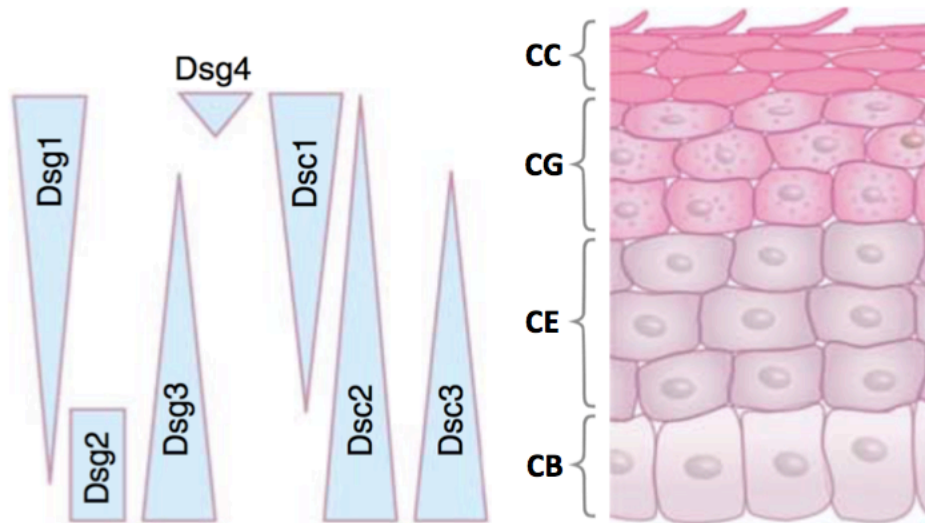


Figure 3. – Expression des isoformes des cadhérines desmosomales dans l'épiderme (adaptée de Green et Simpson, 2007)

## 2- Le pemphigus

### 2.1 Épidémiologie

Les deux principaux types de pemphigus sont le PV et le PF. Il s'agit d'un diagnostic rare avec une incidence d'environ 1-5 cas par million d'habitants par année en Amérique du Nord, et qui se présente en moyenne entre l'âge de 40 et 60 ans [20, 21]. Les données sont similaires en France avec une incidence estimée à 1,85 cas par million d'habitants par année [22], mais celle-ci varie beaucoup selon les régions du monde. On retrouve par exemple une incidence allant jusqu'à 16-32 cas par million d'habitants par année chez les personnes de descendance juive, probablement en lien avec des facteurs génétiques. Le PV représente 60-90% des cas de pemphigus et le PF, de 10 à 40% [20]. Cette proportion varie encore beaucoup selon les régions, comme au Brésil ou en Tunisie où le PF est nettement plus fréquent, particulièrement en raison du Fogo selvagem, une variante endémique de PF. Cette variante serait induite par la piqûre d'une mouche noire de la famille *Simulium* spp. ; la transmission de la protéine salivaire LJM11 ayant des similitudes avec la Dsg1 aboutirait à une réaction croisée avec cette cible antigénique [23].

## 2.2 Classification du pemphigus

En plus du PV et du PF, le pemphigus paranéoplasique (PPN) représente la troisième grande forme de pemphigus. On y retrouve aussi une forme atypique de PV, soit le pemphigus végétant, trois formes atypiques de PF, soit le pemphigus érythémateux, le Fogo selvagem et le pemphigus herpétiforme, et finalement des cas plus rares de pemphigus à IgA et de pemphigus induit par les médicaments (voir Tableau 1). Il existe deux formes de pemphigus à IgA, soit la pustulose sous-cornéenne et la dermatose neutrophilique intraépidermique. Nous aborderons seulement le PV et le PF qui sont les deux pemphigus à l'étude dans ce mémoire et qui, à eux seuls, représentent 90-95% des cas.

Classification du pemphigus
Pemphigus vulgaire (PV) <ul style="list-style-type: none"><li>• Pemphigus végétant</li></ul>
Pemphigus foliacé (PF) <ul style="list-style-type: none"><li>• Pemphigus érythémateux (variante localisée)</li><li>• Fogo Selvagem (variante endémique)</li><li>• Pemphigus herpétiforme</li></ul>
Pemphigus paranéoplasique (PPN)
Pemphigus à IgA <ul style="list-style-type: none"><li>• Pustulose sous-cornéenne</li><li>• Dermatose neutrophilique intra-épidermique</li></ul>
Pemphigus médicamenteux
Pemphigus gestationnel

Tableau 1. – Classification du pemphigus

### 2.2.1 Pemphigus vulgaire

Le PV se présente soit en forme muqueuse, cutanéomuqueuse ou plus rarement, en forme exclusivement cutanée. Les lésions débutent généralement aux muqueuses orales sous forme d'érosions douloureuses à fond rouge vif avec un leucoedème qui atteignent la muqueuse buccale et palatine (voir Figure 4A). Des lésions sur les muqueuses gingivales et

linguales sont aussi possibles. La lésion primaire sous forme de vésicule ou bulle flasque est rarement vue à cet endroit compte tenu de la fragilité de l'épithélium. Environ 50% des patients développeront aussi des lésions cutanées sous forme de vésicules ou bulles flasques laissant place à des érosions souvent croûtées sur une peau saine ou érythémateuse avec une évolution pouvant être extensive (voir Figure 4B/C). Les sites typiques sont la tête, le tronc supérieur et les grands plis, tels que les aines. Les lésions touchant les zones intertrigineuses peuvent d'ailleurs former des plaques végétantes avec le temps, qui sont formées par une prolifération excessive des KC et apparaissent comme une plaque papillomateuse. On voit principalement celles-ci dans le pemphigus végétant. Les lésions sont typiquement douloureuses, mais peu prurigineuses. Au niveau oral, les lésions et la douleur peuvent mener à une diminution de la capacité à s'alimenter et induire une perte de poids et une dénutrition. Plus rarement, les autres muqueuses (nasale, conjonctivale, laryngée, pharyngée, génitale ou anale) peuvent être touchées et induire des symptômes locaux (voir Figure 4).

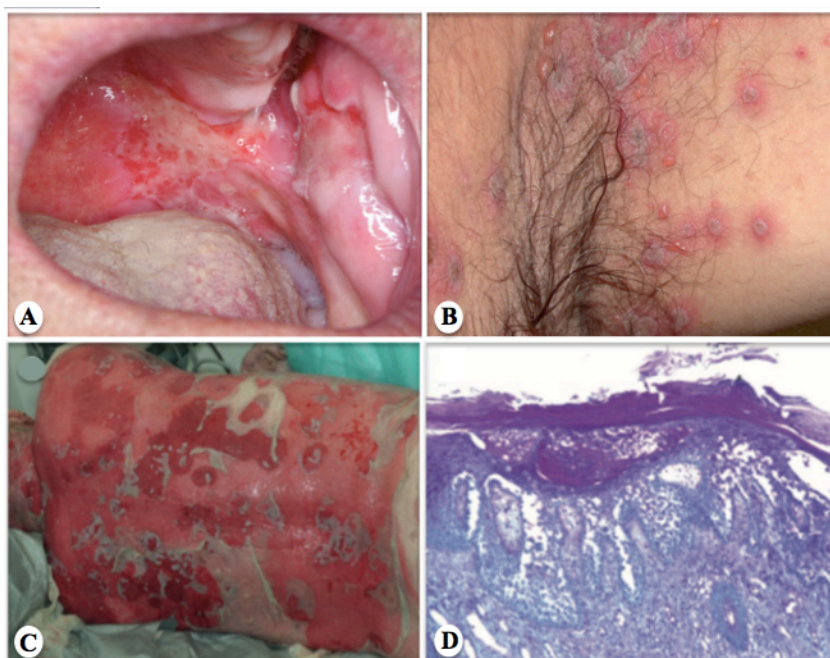


Figure 4. – Présentation anatomo-clinique du pemphigus vulgaire (adaptée de Schmidt *et al.*, 2019; Bologna *et al.*, 5<sup>e</sup> édition, 2017)

Ce tableau clinique est provoqué par le dépôt d'Ac sur des cibles épidermiques. Actuellement, selon la théorie de compensation de la desmogléine (TCD) sur laquelle nous



reviendrons à la section 3.3, l'antigène cible pour les cas de PV muqueux est la Dsg3 seule et pour les formes cutanéomuqueuses, la Dsg1 et la Dsg3 [24]. Jusqu'à maintenant, les cas de PV cutanés sont peu expliqués par cette théorie. En histologie, il y a la formation de bulles par un clivage supra-basal compte tenu de la localisation épidermique de la Dsg3 (voir Figure 4D).

### 2.2.2 Pemphigus foliacé

Le PF touche exclusivement la peau et on n'y retrouve donc jamais d'atteinte des muqueuses. Les patients se présentent typiquement avec des érosions croûtées prurigineuses ayant un aspect en « flocons de maïs », distribuées dans les zones séborrhéiques, soit le visage, le tronc supérieur et le dos supérieur (voir Figure 5A) [24]. Les lésions bulleuses primaires sont rarement vues, puisque le décollement épidermique se forme en superficiel dans l'épiderme, donc elles se rompent facilement en raison de leur fragilité. Occasionnellement, il y a une progression en érythrodermie (voir Figure 5B).

La cible antigénique du PF est la Dsg1 seule, ce qui explique l'histologie des lésions cutanées où on remarque un clivage qui a lieu dans la CG de l'épiderme (voir Figure 5C). Le lieu de clivage est différent du PV compte tenu de l'absence d'Ac anti-Dsg3, qui reste ainsi fonctionnelle dans les couches profondes de l'épiderme, et qui prévient aussi la formation de lésions aux muqueuses.



Figure 5. – Présentation anatomo-clinique du pemphigus foliacé (adaptée de Schmidt *et al.*, 2019; Bologna *et al.*, 5<sup>e</sup> édition, 2017)

## 2.3 Diagnostic du pemphigus

### 2.3.1 Méthodes et critères diagnostics

Le diagnostic du pemphigus repose sur 4 aspects : (1) la présentation clinique, (2) l'histopathologie en peau ou muqueuse lésionnelle, (3) l'immunofluorescence directe (IFD) en peau ou muqueuse péri-lésionnelle et (4) les tests sérologiques [25, 26].

#### 2.3.1.1 Histopathologie

Les spécimens histologiques doivent être prélevés en peau lésionnelle, idéalement d'une lésion récente comprenant une vésicule entière ou la bordure d'une bulle avec le contour de peau inflammatoire. Les changements classiques observés en PV sont un clivage et une acantholyse supra-basale avec les KC basaux résiduels qui rétrécissent et s'apparentent à des pierres tombales. Des KC acantholytiques peuvent aussi être retrouvés dans la cavité de la bulle. En PF, le clivage et l'acantholyse ont lieu dans la couche granuleuse.

#### 2.3.1.2 Immunofluorescence directe

L'IFD est l'examen étalon pour le diagnostic du pemphigus. Les spécimens cutanés sont idéalement transportés dans les milieux de Michel. On y retrouve des dépôts intercellulaires en résille d'IgG, et moins fréquemment de C3, à la surface des KC de l'épiderme ou de l'épithélium. Il n'est pas possible de distinguer un PV d'un PF sur la base seule de cet examen.

#### 2.3.1.3 Tests sérologiques

Les tests sérologiques permettent de démontrer la présence d'Ac circulants, principalement par l'immunofluorescence indirecte (IFI) et l'*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). L'IFI est idéalement faite sur œsophage de singe et démontre des dépôts intercellulaires en résille d'IgG. Quelques trousse commerciales d'ELISA sont disponibles pour mesurer les taux sériques d'IgG anti-Dsg1 et anti-Dsg3. Ils ont l'avantage d'être légèrement plus

sensible que l'IFI, et les taux sériques d'Ac corrént généralement bien avec l'activité de la maladie. Ceci est particulièrement vrai pour les taux sériques d'Ac anti-Dsg1, et moins fréquemment avec les Ac anti-Dsg3 [27]. Il s'agit donc d'outils intéressants pour suivre la réponse clinique du patient et prédire la survenue de rechutes malgré l'absence de lésions cutané-muqueuses, mais les ELISA ne sont malheureusement pas disponibles en routine au Québec pour le moment. Si le diagnostic reste incertain, d'autres méthodes disponibles dans des centres spécialisés peuvent être utilisées, comme l'immunoblot ou l'immunoprécipitation.

### **2.3.2 Évaluation de la sévérité clinique**

Dans les dernières années, des scores d'évaluation clinique ont été développés pour estimer la sévérité clinique du pemphigus. Le plus utilisé actuellement est le *Pemphigus Disease Area Index* (PDAI) qui prend en considération la taille et le nombre de lésions par région anatomique, et est noté sur 250 [28]. Une étude prospective multicentrique a permis de fortement corréler la valeur de ce score aux taux sériques d'Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 mesurés par ELISA, ce qui en fait un outil fiable et reproductible [29]. Un pemphigus léger se définit par un PDAI <15, un pemphigus modéré par un score de 15 à 45 et un pemphigus sévère par un score >45. Il a été récemment démontré qu'un score PDAI >45 lors de la présentation initiale amène un risque de rechute de 50% dans la première année suivant un traitement par rituximab (RTX) [30]. Ces patients sont potentiellement des candidats pour recevoir une perfusion supplémentaire de RTX à 6 mois pour prévenir la rechute clinique.

## **3- Physiopathologie du pemphigus**

Encore à ce jour, les mécanismes exacts causant le pemphigus ne sont pas tous compris. Actuellement, la pathogénèse s'explique fort probablement par un modèle en multiples étapes : i) un individu prédisposé génétiquement, ii) associé à un contexte environnemental conduit iii) à l'activation du système immunitaire. iv) Les lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB) auto-réactifs activés conduisent à la production d'Ac ayant pour cible les protéines de l'adhésion

interkératinocytaire. (v) La liaison des Ac aux KC déclenchent une cascade d'évènements apoptotiques conduisant à l'acantholyse et à la formation de lésions cutanées [31, 32]. La présence d'Ac à la surface des KC est démontrée depuis les toutes premières études de Beutner et Jordon en 1964 [33], et c'est en 1991 qu'une équipe japonaise les a caractérisés comme appartenant à la famille des cadhérines desmosomales [15, 31]. La perte de fonction de ces protéines d'adhésion cellulaire induisant des lésions bulleuses peut aussi être corrélée avec certaines mutations génétiques décrites. Un patient avec une mutation homozygote pour la *DSG3* a récemment été décrit, et celui-ci présentait un tableau typique de PV muqueux [34]. Aussi, une mutation homozygote sur la *DSG1* peut induire une acantholyse similaire au PF [35], tandis qu'une mutation hétérozygote induit une kératodermie palmo-plantaire striée aux sites de friction [36], indiquant une fragilité cutanée suite à la perte de fonction de la Dsg1. Ces données montrent que l'inactivation de la Dsg1 ou Dsg3 par les Ac ou par les mutations génétiques peut induire des lésions bulleuses, ce qui en fait actuellement les cibles d'intérêt dans le pemphigus.

### **3.1 Le développement de l'auto-immunité**

La cascade d'évènements menant au développement de la réponse auto-immunitaire aberrante dans le pemphigus reste encore à clarifier. Il y aurait vraisemblablement la survenue d'un facteur environnemental ou exogène chez un individu avec une prédisposition génétique [37]. Ces facteurs incluent des infections virales à l'herpès simplex ou à l'Epstein-Barr, des traumatismes, des brûlures ou d'autres dermatoses cutanées qui pourraient favoriser la dégradation des antigènes au niveau de la peau et permettre leur présentation antigénique [21, 38]. Certains médicaments avec des groupements thiolés, comme le captopril ou la pénicillamine, ou même des aliments, comme l'ail, ont aussi été décrits et pourraient interférer avec les groupements sulfurés impliqués dans le maintien de la conformation des Dsg [39, 40].

Les études populationnelles démontrent que les gènes des antigènes des leucocytes humains (HLA) sont le facteur génétique le plus associé au pemphigus. Leur rôle s'explique facilement considérant qu'ils sont impliqués dans la présentation d'antigènes [41]. Les HLA sont

localisés sur le bras court du chromosome 6 et se divisent en 2 classes (voir Figure 6). La première contient les HLA-A, HLA-B et HLA-C et encode pour les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I qui ont principalement un rôle dans la présentation des peptides intracellulaires aux LT cytotoxiques ( $CD8^+$ ). La deuxième classe est composée des HLA-DP (DPA/DPB), HLA-DQ (DQA/DQB) et HLA-DR (DRA/DRB1) et encode pour les CMH de classe II qui sont impliqués dans la présentation des peptides extracellulaires aux LT auxiliaires ( $CD4^+$ ), aussi appelés Th (T *helper*). Les CMH sont localisés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et permettent l'activation des LT spécifiques à l'antigène présenté. Les gènes HLA de classe II, particulièrement le DRB1\*0402 chez la population juive ashkénazes et le DQB1\*0503 chez la population non-juive caucasienne et asiatique, sont bien décrits dans le PV [42-44]. Plus récemment, une association avec le HLA-DRB1\*1404 a aussi été décrite chez une population chinoise Han [45]. Les données actuelles laissent croire qu'une personne doit posséder un HLA de classe II capable de présenter un fragment peptidique spécifique de la Dsg aux LT pour induire une réponse auto-immunitaire [24, 46]. Cette restriction à certains HLA de classe II, dont le DRB1\*0402, est justement démontrée chez des souris transgéniques pour l'allèle chez qui l'administration de fragments peptidiques de la Dsg3 induit la production d'Ac anti-Dsg3, mais pas chez les souris non transgéniques pour le DRB1\*0402 [47]. Les HLA impliqués dans le pemphigus encodent en effet des CMH de classe II ayant une avidité accrue pour les fragments peptidiques de Dsg et faciliteraient leur présentation antigénique [48]. Certaines mutations dans des gènes non HLA sont aussi décrites, comme la *DGSG3*, l'*IL-6*, la *TAP2* et la *ST18* [49]. Cette dernière encode une protéine pro-apoptotique et pro-inflammatoire dont la présence peut être accrue dans la peau de patients atteints de pemphigus [50].

Chez les patients atteints de pemphigus, une perte de tolérance du soi est remarquée autant dans la population de LT que de LB. En effet, la présence de LT auto-réactifs anti-Dsg1/3 est décrite chez les patients atteints de pemphigus et serait essentielle à l'émergence de LB auto-réactifs [51, 52]. Cette notion est d'ailleurs supportée par la démonstration qu'un Ac monoclonal (Acm) anti-CD154, qui bloque le signal de costimulation du CD40L-CD40, peut supprimer la production d'Ac anti-Dsg3 chez la souris [53]. Le pemphigus est une maladie principalement associée à un profil Th2 de par la présence sérique accrue d'interleukine (IL)-

4, IL-10 et IL-13 chez ces patients [48, 54], et ce profil explique bien la commutation isotypique vers l'IgG4 qui est le principal isotype retrouvé [55]. Veldman *et al.* ont d'ailleurs démontré que la présence de LT auto-réactifs anti-Dsg3 chez les individus en bonne santé était de type Th1, tandis que les patients atteints de pemphigus avaient une prédominance de Th2 [56]. Ces LT auto-réactifs contribuent, par les signaux tels que les cytokines et les molécules de co-stimulation, à l'activation des LB naïfs et à leur différenciation en LB mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'Ac. Le rapport Th1/Th2 influence également la commutation isotypique des immunoglobulines (Ig). En effet, les cytokines Th1, tels que l'IFN- $\gamma$ , favorisent la commutation vers l'isotype IgG1, tandis que les cytokines Th2, comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, favorisent la commutation vers l'isotype IgG4 qui est associé à la pathogénicité des Ac anti-Dsg [57].

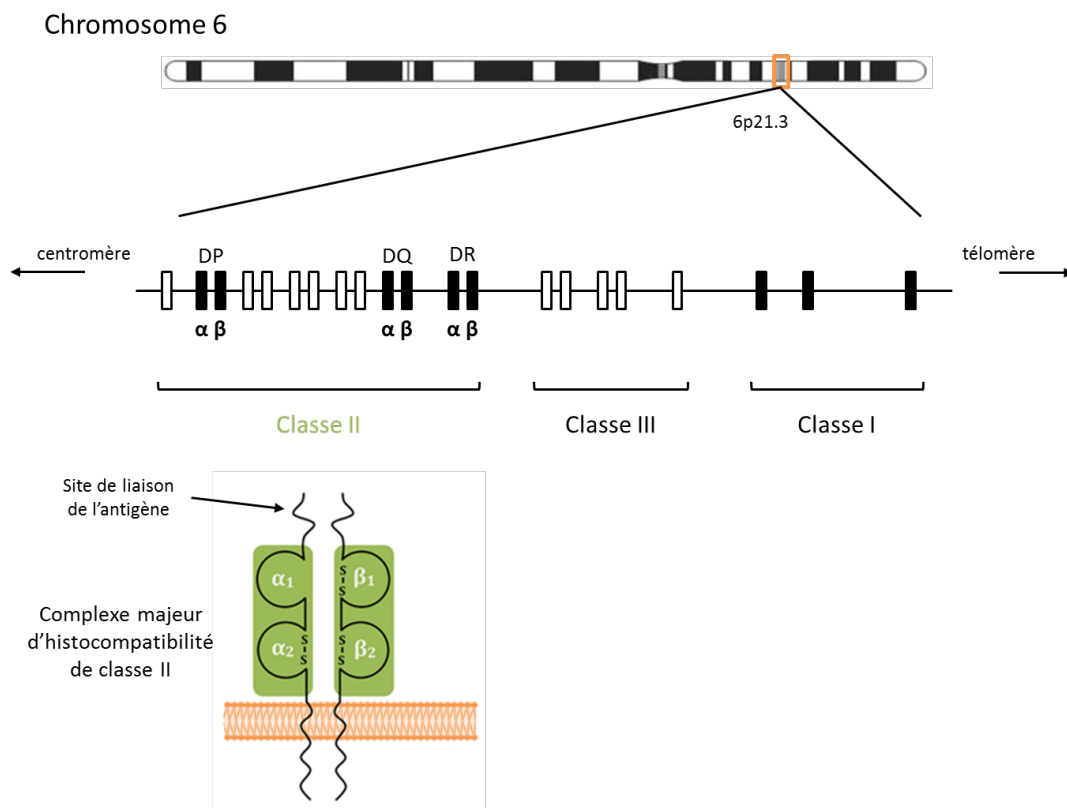


Figure 6. – Représentation du complexe majeur d'histocompatibilité (gracieuseté de Marie-Laure Golinski, 2014)

### 3.2 Les auto-anticorps

Le pemphigus est une des maladies auto-immunes pour laquelle la présence d'auto-Ac est bien décrite et pour lesquels le pouvoir pathogène est démontré. En effet, l'immunoabsorption spécifique en utilisant de la Dsg1 et Dsg3 recombinantes abolit la pathogénicité *in vitro* des IgG purifiés des patients atteints de pemphigus [32, 58, 59]. Les souris *knockout* en Dsg3 développent des lésions muqueuses semblables au PV [10, 60], et le transfert passif d'IgG anti-Dsg1 et anti-Dsg3 chez des souris néonatales induit le développement d'un phénotype de pemphigus [61], de même que le transfert adoptif de LT et LB auto-réactifs anti-Dsg3 issus de souris Dsg3<sup>-/-</sup> chez des souris immunodéficiente Rag2<sup>-/-</sup> [62]. Ce phénomène de transfert passif peut être transposé aux femmes enceintes atteintes de PV chez qui le passage transplacentaire d'IgG anti-Dsg3 peut induire transitoirement des lésions bulleuses aux nouveau-nés [63]. Ces lésions persistent généralement quelques semaines et sont auto-résolutives jusqu'à la dégradation des IgG de la mère.

#### 3.2.1 Les immunoglobulines

Les Ig sont composées de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères identiques, le tout maintenu par les ponts disulfures. Elles sont classifiées selon les chaînes lourdes qui les composent, soit en IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM, et sont chacune associées à l'une des deux chaînes légères, kappa ou lambda. Les IgA sont sous-divisées en IgA1 et IgA2, et il existe 4 isotypes pour les IgG, soit IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 [64]. Chaque chaîne légère contient une région variable et une région constante, tandis que les chaînes lourdes contiennent une région variable avec 3 ou 4 régions constantes. La structure se divise en fragment Fab (*Fragment antigen binding*) au niveau des chaînes légères et en fragment Fc (Fragment cristallisable) au niveau des chaînes lourdes. Les régions variables sont elles-mêmes composées de 3 régions hyper-variables (CDR : *complementary determining region*), dont le CDR3 qui agit comme principal site de reconnaissance de l'antigène. Le fragment Fab s'associe donc principalement aux fonctions de reconnaissance de l'antigène, tandis que le fragment Fc s'assure des fonctions effectrices de l'Ac. En effet, il peut activer la voie classique du complément C1q et former le complexe

d'attaque membranaire (CAM) assurant la cytotoxicité dépendante du complément (CDC). Le fragment Fc peut aussi se lier à ses récepteurs FcR, entre autres présents sur les cellules tueuses naturelles, ou *natural killer* (NK), et assurer la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC), ou sur les macrophages pour faciliter la phagocytose par opsonisation.

### **3.2.2 Les isotypes d'immunoglobulines anti-Dsg chez les patients pemphigus**

Plusieurs études ont étudié le profil isotypique des IgG anti-Dsg chez les patients atteints de pemphigus. Les données actuelles démontrent qu'en maladie active aiguë ou chronique, on retrouve une plus grande proportion d'IgG4 anti-Dsg que d'IgG1, et beaucoup plus rarement des IgG2 et IgG3 [55, 65, 66]. La présence d'IgG4 anti-Dsg est importante à un tel point que la quantité sérique totale d'IgG4 est augmentée chez les patients atteints de pemphigus [67], alors qu'à l'état de base, cette sous-classe représente moins de 5% des IgG totaux. Quant à l'évolution des sous-classes, les données sont contradictoires, puisque certains auteurs ont mis en évidence que les patients en rémission clinique auraient une prédominance d'IgG1 anti-Dsg3, lorsque les Ac sont encore détectables [65, 66, 68], mais d'autres ne sont pas parvenus à cette même conclusion [55, 69]. Il arrive même de détecter des IgG1 anti-Dsg chez les parents de premier degré de patients atteints de pemphigus, et ce, avec aucun signe clinique de la maladie [70, 71]. De plus, certains patients en rémission clinique présentent toujours des titres élevés d'Ac anti-Dsg, ce qui supporte l'hypothèse de la présence d'Ac non pathogènes ayant des caractéristiques et ciblant des épitopes différents [72, 73]. Des études avec le *Fogo selvagem*, soit la variante endémique de PF, ont justement démontré que plus de 50% des personnes vivants en zones endémiques au Brésil possèdent des Ac anti-Dsg1. Toutefois, les patients avec des signes cliniques présentent des IgG4 dirigés contre les domaines EC1 et EC2, alors que les parents de 1<sup>er</sup> degré non malades présentent des IgG1 et IgM dirigés contre les domaines EC5 [23, 74]. La sous-classe d'IgG et la spécificité épitopique sont donc importantes dans la pathogénèse du pemphigus.

Cette prédominance d'IgG4 concorde bien avec le profil Th2 du pemphigus. En effet, la présence accrue d'IL-4 et IL-13 favorise la commutation isotypique des LB pour produire des



IgG4 [67], et l'IL-10 peut potentialiser la production d'IgG4 à la place d'IgE [75]. La déplétion en IgG4 des Ig sériques de patients atteints de pemphigus diminue significativement la pathogénicité des Ac [67]. Par ailleurs, des études ont démontré que les fragments Fab des IgG Dsg-spécifiques peuvent induire une acantholyse à eux seuls, sans avoir besoin de l'activation du complément [76-78]. Le fragment Fc et le système du complément sont donc peu contributives dans la pathogénèse du pemphigus, en accord avec l'isotype IgG4 qui est connu pour ne pas interagir avec celui-ci. La pathogénicité des Ac anti-Dsg serait donc en grande partie attribuée aux IgG4. Toutefois, les IgG1 dirigés contre la Dsg1 ou Dsg3 ont aussi démontré leur pathogénicité [79], contribuant potentiellement à l'acantholyse avec les IgG4, mais la pathogénicité des IgG2 et IgG3 n'a jamais été démontrée.

Des études ont aussi mis en évidence la présence d'IgA et d'IgE anti-Dsg [66, 80], avec une spécificité antigénique généralement similaire entre les différents isotypes [81]. Nagel *et al.* ont mesuré des taux significativement plus élevés d'IgE anti-Dsg3 chez 37 patients atteints de PV et en maladie active, en plus de détecter leur présence tissulaire en IFD et IFI [82]. Ceci supporte aussi la polarisation Th2 vue dans le pemphigus sachant que l'IL-5 est une cytokine favorisant la commutation isotypique en IgE.

À ce jour, il y a encore peu de données pour comprendre la signification clinique d'une diversité isotypique dans le pemphigus et l'évolution de ces isotypes en cours de maladie.

### **3.2.3 Mécanisme de l'acantholyse par les auto-anticorps anti-desmogléine**

Comme mentionné, les Ac anti-Dsg1 ou anti-Dsg3 parviennent à exercer leur pouvoir pathogène à eux seuls, sans interagir avec le système du complément. La reconnaissance antigénique et la fixation à la cible au niveau épidermique suffisent donc à induire une perturbation de la cohésion intercellulaire. Cette perturbation induit le phénomène d'acantholyse, soit un détachement des KC qui mène à la formation des lésions bulleuses intra-épidermiques. Cette acantholyse serait induite par deux mécanismes suivant la fixation des Ac : les anti-Dsg1 et anti-Dsg3 (1) nuisent directement aux fonctions adhésives des Dsg par encombrement stérique et (2) altèrent les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans

les mécanismes d'adhésion.

En effet, l'encombrement stérique est vraisemblablement un mécanisme d'action, suite à la démonstration que les Ac anti-Dsg des patients atteints de pemphigus ciblent en forte majorité la forme mature de la protéine [83], et plus précisément les épitopes situés aux domaines extracellulaires N-terminaux, soit EC1 et EC2 [84]. Les propriétés adhésives des cadhérines desmosomales se situent au niveau de ces domaines et sont dépendantes de la conformation maintenue par le  $Ca^{2+}$ . Justement, les Ac présents chez les personnes ne présentant pas de signes cliniques de la maladie ciblent plus souvent les épitopes proximaux à la membrane cellulaire, comme EC3, EC4 et EC5 [23, 85], en plus d'être un isotype différent de l'IgG4, comme mentionné à la section 3.2.2. Il a aussi été démontré que des individus sains peuvent avoir des Ac dirigés contre les formes précurseurs de la Dsg1, mais non la forme mature, ce qui laisse suspecter que la tolérance des LB est spécifique à cette forme mature et fonctionnelle [86]. Dans un modèle murin de PV, Tsunoda *et al.* ont cloné plusieurs Acm murins anti-Dsg3. Les IgG anti-Dsg3 pathogènes reconnaissent principalement l'extrémité N-terminale du domaine EC1, alors que les IgG anti-Dsg3 non pathogènes reconnaissent les parties médianes ou C-terminales. Parmi eux, l'Acm murin AK23 présentait une activité hautement pathogène [87].

Dans un second temps, la fixation des Ac à leurs épitopes et la désorganisation des desmosomes modifient les voies de signalisations intracellulaires. La voie de la *mitogen-activated protein kinase P38* (P38-MAPK) a été particulièrement étudiée et son activité est augmentée dans la peau des patients atteints de pemphigus [88], en plus de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR), la tyrosine kinase Src, la protéine kinase C et la Rho-GTPase A [24]. La phosphorylation des protéines de ces voies intracellulaires est induite suite à leur activation et mène à une internalisation des Dsg à la surface des KC et à une réduction de l'assemblage de nouveaux desmosomes [89, 90]. La fixation d'Ac anti-Dsg mène effectivement à une diminution de la quantité de Dsg présente à la surface des KC [91, 92]. Ceci mène à la rétraction des filaments intermédiaires du cytosquelette et participe à la perte de cohésion interkératinocytaire, et cette rétraction explique l'aspect en «pierre tombale» des KC vu en histologie. L'utilisation *in vitro* et *in vivo* d'inhibiteurs de ces voies, dont la P38-MAPK [89, 93-95]

ou la Src [96], ont justement démontré leur capacité à réduire la formation d'acantholyse et de lésions bulleuses.

Les données actuelles soutiennent donc que les Ac peuvent induire l'acantholyse à eux seuls par encombrement stérique, mais que l'activation des voies de signalisations intracellulaires accentue l'acantholyse [97], et que ces deux mécanismes interagissent étroitement [98, 99].

### **3.3 La théorie de compensation de la desmogléine**

Actuellement, la TCD est la plus répandue pour expliquer la présentation histologique et clinique des patients atteints de pemphigus [24] (voir Figure 7). Celle-ci est une théorie monopathogénique, puisqu'elle prend en considération exclusivement la présence d'Ac anti-Dsg, spécifiquement les anti-Dsg1 et anti-Dsg3. En effet, la majorité des patients possèdent des Ac anti-Dsg1 ou anti-Dsg3 qui expliquent leur phénotype clinique [31, 100]. La TCD se base sur le fait que, selon la distribution épidermique de la Dsg1 et Dsg3, tel que décrit à la section 1.1.4, lorsque les deux protéines sont présentes dans la même couche épidermique ou épithéliale, l'une peut compenser pour la perte de fonction de l'autre. Le profil sérologique d'IgG anti-Dsg1 et anti-Dsg3 d'un patient peut donc prédire son phénotype clinique et histologique [101].

Ainsi, la présence seule d'Ac anti-Dsg3 prédit un PV muqueux avec un clivage supra-basal, puisque la présence de Dsg1 dans la peau compense pour la perte de Dsg3 et prévient la survenue de lésions cutanées, mais sa présence dans les muqueuses est trop faible. La présence d'Ac anti-Dsg3 et anti-Dsg1 prédit quant à elle un PV cutanéomuqueux, avec un clivage supra-basal à l'histologie. Finalement, la présence seule d'anti-Dsg1 est associée au PF et se présente par une atteinte exclusivement cutanée, comme la présence de Dsg3 dans les muqueuses prévient la perte de cohésion. En histologie, le clivage sera alors dans la couche superficielle de l'épiderme, car la Dsg3 est présente en grande partie dans les couches supra-basales et compense pour la perte de fonction de la Dsg1 [24, 102]. Plusieurs données soutiennent cette théorie par des études *in vivo*. Des souris transgéniques chez qui l'expression de la Dsg3 a été introduite dans les couches superficielles de la peau étaient protégées contre l'action des anti-

Dsg1 issus de patients atteints de PF, soulignant la compensation de la Dsg3 [103]. Aussi, chez les souris néonatales, la perte de fonction de la Dsg3 induit aussi une alopecie par la perte des cheveux en phase télogène; toutefois, l'induction de l'expression de la Dsg1 au niveau des follicules pileux retarde l'apparition de ces lésions, fort probablement par sa compensation [104].

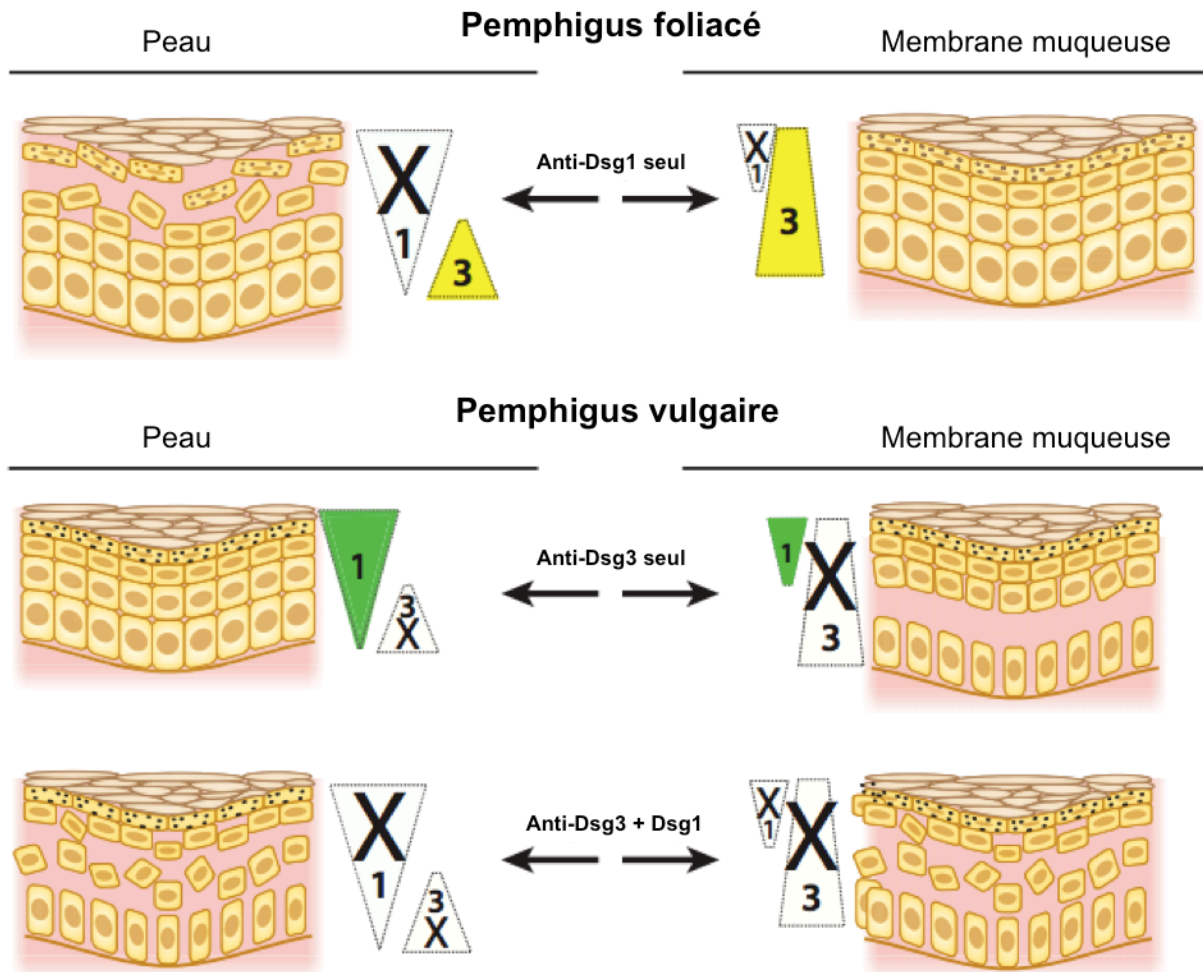


Figure 7. – Représentation schématique de la théorie de compensation de la desmogléine (adaptée de Hammers *et al.*, 2016)

### 3.3.1 Limites de la théorie de compensation de la desmogléine

Malgré que la TCD soit encore à ce jour la théorie la plus répandue pour expliquer cette pathogénèse, elles possèdent quelques limites et ne parvient pas à expliquer tous les cas de pemphigus. En effet, les profils sérologiques d'Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 ne corrèlent pas avec

les phénotypes cliniques des patients dans environ 30% des cas, et ce, dans plusieurs séries [73, 105-107]. Il y a en effet plusieurs cas de pemphigus cutanéomuqueux présentant exclusivement des anti-Dsg3, ou même des cas de PV exclusivement cutané à anti-Dsg3 seuls [108]. Cette dernière présentation n'est toujours pas clairement expliquée à ce jour, puisque la présence seule d'anti-Dsg3 devrait induire des lésions aux muqueuses et être compensée par la Dsg1 au niveau cutané. Une récente série démontrait que jusqu'à 5% des cas de PV ont un phénotype exclusivement cutané [109]. Il est important de bien distinguer les PV cutanés qui ont un clivage en suprabasal à l'histologie, et les cas de PF, qui eux, ont un clivage dans les couches superficielles de l'épiderme. Yoshida *et al.* ont été les premiers à rapporter 4 cas de PV cutanés ; ils démontraient que les taux sériques supérieurs et la pathogénicité plus importante des Ac anti-Dsg1 comparativement aux anti-Dsg3 pouvaient expliquer le phénotype clinique [108], mais plusieurs autres cas ne présentent pas d'anti-Dsg1 et ne se conforment pas à la TCD [110]. Des cas de PV muqueux à anti-Dsg1 seuls ont même été décrits [111]. Certaines cohortes rapportent aussi jusqu'à 10% de cas de pemphigus avec l'absence d'Ac anti-Dsg1 et d'anti-Dsg3 [105, 112].

Une revue systématique regroupant 789 cas de pemphigus a justement résumé ces trouvailles en corrélant les profils cliniques et sérologiques déterminés par ELISA [113]. Parmi les PV muqueux, seulement 69% des cas avaient des Ac anti-Dsg3, et 40% des Ac anti-Dsg1. Les PV cutanéomuqueux avaient quant à eux des Ac anti-Dsg3 dans 78% des cas, et des Ac anti-Dsg1 dans 68%. Finalement, les PV cutanés présentaient des Ac anti-Dsg3 dans 49% des cas, et des Ac anti-Dsg1 dans 82%, et 25% des cas de PF étaient positifs en anti-Dsg3. Ainsi, ces données soulignent que cette théorie monopathogénique ne s'applique pas à tous les cas de pemphigus et selon ces auteurs, une mise à jour s'impose, puisque celle-ci se base sur des études sérologiques qui datent de plusieurs années [101, 113]. Selon plusieurs auteurs, ces exceptions à la TCD pourraient entre autres être expliquées par la présence d'Ac non spécifiques à la Dsg.

### 3.4 Les auto-anticorps non spécifiques à la desmogléine

Dans les dernières années, plusieurs Ac non spécifiques à la Dsg ont été décrits chez les patients atteints de pemphigus. Les premières données datent en fait de 1998 quand Vu *et al.* ont identifié des Ac dirigés contre les récepteurs à l'acétylcholine [114]. Ceux-ci peuvent influencer la phosphorylation des protéines impliquées dans le maintien du cytosquelette des KC via l'activation des protéines kinases, causer un rétrécissement de la cellule et ainsi favoriser le détachement avec les KC adjacents [115, 116]. Cette traction pourrait même exposer certaines cibles antigéniques, dont les Dsg, et déclencher la réaction auto-immunitaire subséquente [117].

Des études plus récentes ont utilisé des puces à protéines pour identifier plus de 50 autres Ac chez les patients pemphigus [118-120]. Ceux-ci incluent les Dsc, les récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique [121] et nicotinique [122], les protéines mitochondriales [123, 124], la pemphaxine et la thyroïde peroxidase. La pertinence physiopathologique et clinique de ceux-ci reste à déterminer, mais quelques données ont démontré le pouvoir pathogène de certains Ac qui pourraient agir en synergie avec les Ac anti-Dsg ou, dans de plus rares cas, seuls pour induire l'acantholyse [99, 125, 126]. Chervnasky *et al.* ont récemment démontré que le transfert passif d'IgG anti-Dsc3, anti-récepteur à l'acétylcholine muscarinique de type 3 (CHRM3) et anti-transporteur de  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  ATPase de type 2C1 (SPCA1) pouvait induire un phénotype de pemphigus en synergie [127]. Le mémoire actuel se concentre sur la description de la Dsc3.

#### 3.4.1 La desmocolline 3

La Dsc3 est une protéine de 100 kDa faisant partie du groupe des cadhérines desmosomales  $Ca^{2+}$ -dépendante, tout comme les Dsg. Elle est encodée par le chromosome 18q12.1 et synthétisée en précurseur inactif contenant une proséquence qui produit une protéine active et mature après un clivage par une convertase [18, 83]. Elle est aussi composée de 5 domaines extracellulaires EC1 à EC5, incluant le domaine d'EA, d'un TM, d'un IA et d'ICS. Chaque Dsc a la particularité d'avoir deux domaines ICS distincts issus de l'épissage de l'ARN du

même gène, soit la forme a- (longue) et b- (courte), dont la seule différence est dans la séquence de leur partie cytoplasmique C-terminale [9, 128] (voir Figure 8). Le clivage du précurseur de la protéine par une proprotéine convertase est une étape essentielle, puisqu'elle permet d'exposer le domaine EC1, principal site d'interaction hétérophile, en plus d'être un épitope fréquemment reconnu par les Ac pathogènes des patients atteints de pemphigus (voir Figure 9) [77, 83, 84, 129, 130].

Dans l'épiderme, la Dsc3 est présente en grande partie dans les couches supra-basales avec une distribution similaire à la Dsg3 (voir Figure 3). Chaque desmosome contient une paire de Dsg et de Dsc qui participe aux interactions *cis* et *trans* homophiles et hétérophiles. Il est de plus en plus évident que la Dsc3 est essentielle au maintien de la cohésion kératinocytaire. En effet, des Acm anti-Dsc3 induisent la formation d'un clivage supra-basal dans un modèle *in vitro* de peau humaine en affectant les interactions *trans* homophiles et hétérophiles [131]. Ces Ac pourraient même induire une acantholyse plus précoce et sévère que les anti-Dsg3 seuls *in vitro* [132]. Une récente étude a aussi démontré que les IgG anti-Dsg issus de patients atteints de PV affecteraient principalement les liaisons *trans* hétérophiles entre les Dsg et les Dsc pour induire l'acantholyse [18].

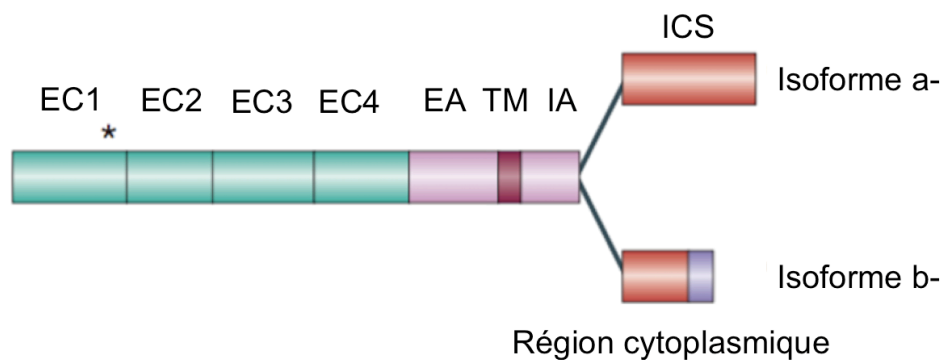


Figure 8. – Structure moléculaire de la desmocolline 3 (adaptée de Getsios *et al.*, 2004)

La Dsc3 est une cible d'intérêt dans l'étude des Ac non-Dsg suite à la démonstration que des souris déficientes en Dsc3 au niveau épidermique présentaient des érosions cutanées

similaires aux patients atteints de PV [128], et en partie similaire aux souris déficientes en Dsg3 [10]. Ce modèle de souris présente un déficit exclusivement au niveau épidermique et a dû être produit pour démontrer l'importance de la Dsc3 dans la peau, comme une mutation en Dsc3 est létale avant même l'implantation embryonnaire [133]. Les desmosomes jouent en effet un rôle essentiel dans le développement embryonnaire [6]. Une équipe italienne a aussi récemment produit un modèle murin de pemphigus par le transfert adoptif de lymphocytes Dsc3- et Dsg3-spécifiques à une souris immunodéficiente Rag2<sup>-/-</sup> [134]. La production d'Ac anti-Dsc3 induisait un phénotype clinique semblable au PV, et surtout, la combinaison avec les anti-Dsg3 menait à un phénotype plus sévère.

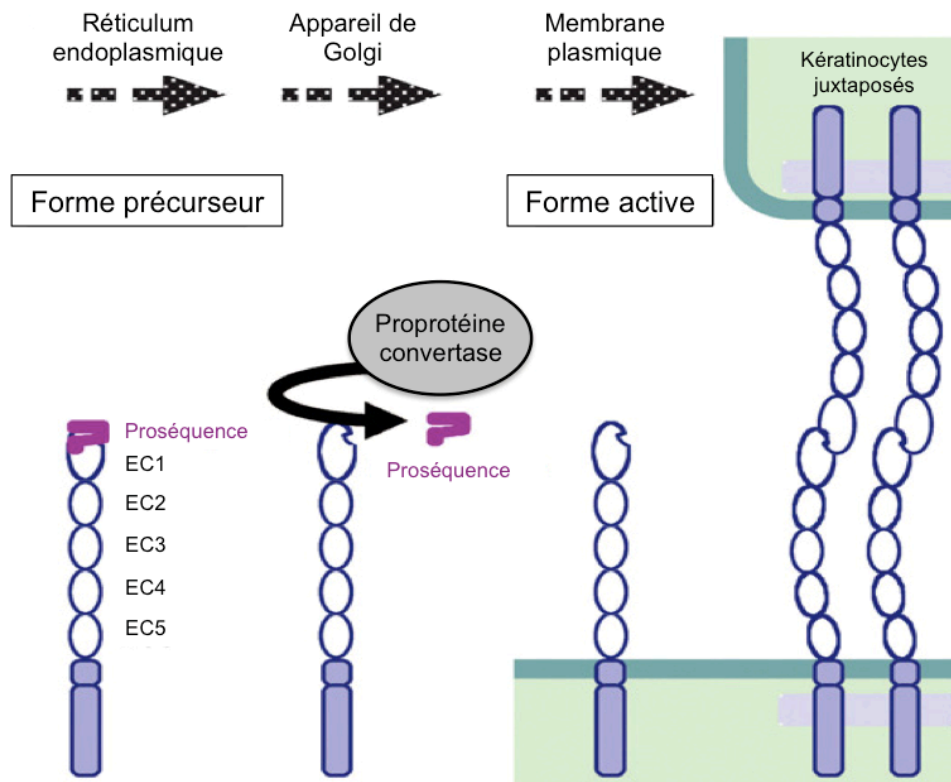


Figure 9. – Production du précurseur et de la forme mature d'une cadhérine desmosomale (adaptée de Yokouchi *et al.*, 2009)

Chez l'humain, la Dsc1 a bien été associée à la dermatose pustuleuse sous-cornéenne, un des deux sous-types de pemphigus à IgA [135, 136]. Par contre, la pertinence et l'importance de la Dsc3 reste quant à elle à clarifier. La présence d'anti-Dsc3 ciblant la portion extracellulaire est



rapportée dans quelques rapport de cas, incluant le pemphigus hérpétiforme [137-142], le pemphigus végétant [143-145] et d'autres cas de pemphigus atypiques [146-150], incluant des cas pédiatriques [151, 152]. Plusieurs séries sur des cas de PV et PF typiques ont toutefois démontré 0% d'IgG ou d'IgA d'anti-Dsc3 par méthode ELISA en utilisant une protéine recombinante produite par système de baculovirus en cellules d'insectes [153], par immunoblot [154] ou par la mise au point d'une immunofluorescence avec des cellules transfectées [155, 156]. Par contre, la présence d'anti-Dsc3 est identifiée jusqu'à 10% des cas de pemphigus atypiques ou PPN [153, 155, 156], et même jusqu'à 60% lorsque la Dsc3 utilisée est produite en cellules de mammifères [157, 158]. Ceci porte à croire que la conservation des épitopes conformationnels est essentielle pour la Dsc3. Hisamatsu *et al.* ont justement remarqué une absence de corrélation entre 8 sérums de patients pour les anti-Dsc3 : on les détectait chez 7/8 patients lorsque la Dsc3 était transfectée dans les cellules COS-7, comparativement à 1/8 en ELISA avec les mêmes sérums [156]. Ainsi, la mise au point de l'ELISA en utilisant une protéine recombinante produite en cellules de mammifères a permis de détecter des Ac anti-Dsc3 extracellulaire dans 18% des cas de pemphigus typiques (PV et PF) [157, 159]. L'utilisation d'une technique par criblage de puces à protéines dans une cohorte de 264 patients atteints de pemphigus a détecté les anti-Dsc3 chez 44% des malades comparativement à 7% des donneurs sains [118]. Toutes ces études se concentraient d'ailleurs sur les Ac ciblant les portions extracellulaires de la Dsc3, mais plus récemment, Chervnyasky *et al.* ont démontré la contribution d'Ac anti-Dsc3 ciblant une portion intracellulaire dans le développement d'un phénotype de pemphigus en milieu *in vivo* [127]. Toutefois, la réelle prévalence de ces Ac intracellulaires et surtout leurs réels impacts cliniques et pathogéniques restent à déterminer. Jusqu'à maintenant, aucune évidence ne permet d'affirmer que des Ac dirigés contre des portions intracellulaires de la Dsg ou de la Dsc seraient pathogènes dans les cas de PV ou de PF.

#### **4. Traitement du pemphigus**

Les taux de mortalité et de morbidité associés au pemphigus ont grandement diminué depuis l'introduction des corticostéroïdes (CS) systémiques dans l'arsenal thérapeutique dans

les années 1950 [22]. Toutefois, la chronicité de cette pathologie nécessite souvent un traitement de longue durée qui est associé à de multiples complications, incluant des cytopénies, de l'hypertension, du diabète cortico-induit, de l'ostéoporose, des ulcères peptiques et des complications liées à l'immunosuppression qui se présentent principalement par des infections opportunistes. Ces dernières sont désormais la principale cause de mortalité chez les patients atteints de pemphigus traités par CS systémiques, soit d'environ 5% [160].

Plusieurs références ont récemment proposé une revue des lignes de traitements pour le pemphigus [21, 25, 161, 162], qui ne seront pas abordées en détails dans ce mémoire. À ce jour, le traitement de première intention est l'utilisation de CS systémiques, souvent associés à un agent épargneur de CS. Les agents conventionnels incluent le mycophénolate mofétil, l'azathioprine et le cyclophosphamide. Ces agents apportent toutefois peu de bénéfices. Une méta-analyse comprenant 10 études et 559 patients a démontré que l'ajout d'un de ces agents ne fait que diminuer le taux de rechute de 29%, mais n'améliore pas le taux de rémission clinique et ne diminue pas les effets secondaires graves [163]. Toutefois, l'utilisation plus récente du RTX a nettement amélioré le pronostic des patients atteints de pemphigus [164].

#### **4.1 Le rituximab**

Le RTX est un Acm chimérique anti-CD20 de type IgG1, dont les premières utilisations étaient surtout réservées à l'oncologie, entre autres pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome non hodgkinien [165]. Depuis, son utilisation s'est étendue et inclut désormais de multiples maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux disséminé (LED) [166], la polyarthrite rhumatoïde (PAR) [167], la sclérose en plaques [168], l'anémie hémolytique auto-immune [169], le purpura thrombocytopénique idiopathique [170], et bien sûr, les dermatoses bulleuses auto-immunes.

Le CD20 est exprimé à la surface des pré-LB jusqu'aux LB matures et mémoires, incluant les LB auto-réactifs [171]. Il n'est par contre pas exprimé sur les progéniteurs des LB et plasmocytes/plasmablastes responsables de la sécrétion des Ac, préservant ainsi la mémoire immunologique à long terme. Le RTX est composé d'un fragment Fab murin se liant au CD20 et

d'un fragment Fc humain responsable de l'interaction avec les éléments du système immunitaire participant à la déplétion des LB, dont le complément [172, 173].

#### **4.1.1 Utilisation du rituximab dans le traitement du pemphigus**

Le RTX a été utilisé pour la première fois dans le traitement du pemphigus en 2002 [174], et son utilisation a ensuite été démontrée en traitement de deuxième ou troisième intention avec un taux de rémission clinique de 70-75% dans plusieurs études rétrospectives, et avec un taux de rechute allant jusqu'à 60% [175-178]. La plupart des cas peuvent généralement être traités à nouveau avec un autre cycle de RTX lors de la rechute [179, 180]. Il a été démontré qu'une utilisation plus tôt dans l'évolution de la maladie permettait d'augmenter le taux de réponse et le maintien d'une rémission à plus long terme, fort probablement par une déplétion plus importante et complète de la population des LB auto-réactifs et la prévention de la formation d'organes lymphoïdes tertiaires dans la peau [175, 181, 182]. En effet, certaines données récentes supportent la présence de LB et LT auto-réactifs anti-Dsg1 et ou anti-Dsg3 dans la peau des patients atteints de pemphigus [183] ou dans d'autres organes lymphoïdes secondaires [184], et seraient potentiellement moins bien déplétés par le RTX en raison de leur localisation tissulaire. Cette mauvaise déplétion pourrait entre autres expliquer des rechutes, puisque les études démontrent que lors d'une rechute, il y a émergence de LB avec la même clonalité que lors de la présentation initiale [185]. Il y a donc un intérêt à utiliser le RTX en première ligne de traitement dans le pemphigus pour induire une déplétion plus précoce et augmenter son efficacité.

En 2017, l'équipe du Pr Pascal Joly a publié l'étude RITUX3 dans le *Lancet*, une étude randomisée prospective et multicentrique de 90 patients nouvellement diagnostiqués de pemphigus modérés à sévères. Cette étude a comparé l'utilisation en première intention du RTX (1000 mg aux jours 0 et 14, puis 500 mg aux mois 12 au 18) combiné à une courte corticothérapie systémique de 0,5-1 mg/kg/jour sur 3 à 6 mois, à une corticothérapie standard de 1-1,5 mg/kg/jour sur 12 à 18 mois. À 24 mois, 89% des patients du groupe RTX était en rémission complète (RC), comparativement à 34% dans le groupe CS ( $p < 0,0001$ ). L'utilisation du RTX a aussi diminué au tiers la quantité de CS nécessaire au contrôle de la maladie, et a diminué de moitié la survenue d'effets secondaires graves [186]. Le taux de rechute, précédemment

évalué à 50-60%, a été de seulement 24% à 2 ans chez les patients inclus dans l'étude RITUX3. Cette étude a mené à l'approbation rapide du RTX par la *Food and Drug Administration* et l'Agence Européenne de Médecine pour le traitement de première intention des PV modérés à sévères. Le régime le plus souvent utilisé est celui de l'arthrite rhumatoïde avec 2 infusions intraveineuses de 1000mg aux jours 0 et 14. Ce régime a l'avantage d'être moins cher et de nécessiter moins de visites que le régime utilisé dans le traitement du lymphome (375 mg/m<sup>2</sup> chaque semaine pendant 4 semaines), et a peu d'effets secondaires [187, 188]. Il y a quelques mois, la publication de l'étude PEMPLIX a aussi démontré la nette supériorité du RTX comparativement au mycophénolate mofétil avec des taux de RC à 1 an de 40% (25/62) et de 10% (6/63) (p<0,001) dans chacun des groupes, respectivement [189]. À noter que le taux de RC était moins élevé que le 89% rapporté dans l'étude RITUX3 compte tenu que l'évaluation s'est faite à 1 an et qu'il ne s'agissait pas d'un traitement de première intention, ce qui souligne d'ailleurs l'importance de l'utilisation du RTX tôt en début de maladie pour assurer une meilleure réponse clinique.

Récemment, une post-analyse de l'étude RITUX3 a caractérisé le profil des patients ayant eu des rechutes précoces, soit dans les 12 premiers mois. Ces patients avaient une présentation clinique sévère (PDAI >45) et/ou la persistance d'un titre d'Ac anti-Dsg1 >20 UI/mL ou anti-Dsg3 >120 UI/mL à 3 mois. Il a été suggéré que ces patients reçoivent une perfusion supplémentaire de RTX à 6 mois pour favoriser la déplétion des LB persistants [30]. Le profil des patients ayant rechuté tardivement après 12 mois n'est toutefois pas bien étudié pour le moment, et la cause de ces rechutes n'est pas encore caractérisée.

#### **4.1.2 Mécanisme d'action du rituximab**

Le mécanisme d'action du RTX repose sur 3 principaux modes d'action qui induisent l'apoptose des LB (voir Figure 10). Le premier implique l'ADCC au cours duquel les leucocytes, particulièrement les cellules NK, se lient au fragment Fc du RTX via les récepteurs Fcγ (FcγR) et causent l'apoptose du LB par cytotoxicité. Il existe plusieurs FcγR, soit le FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa et FcγRIIIb, qui ont chacun un ligand d'IgG de préférence et dont l'expression

varie selon le type cellulaire [64, 165]. Les cellules NK possèdent exclusivement le récepteur FcγRIIIa, et la présence du polymorphisme génétique V158F pour ce récepteur, ayant démontré son influence dans l'efficacité du RTX, laisse croire que ces cellules sont fortement impliquées dans le mécanisme de l'ADCC [190].

Le deuxième mode d'action important est la CDC. Après fixation au CD20, le RTX peut fixer le C1q et activer le CAM qui induit la cytotoxicité [191]. En troisième lieu, la fixation du RTX au CD20 peut directement activer les voies de signalisation apoptotique impliquant entre autres les caspases. Sauf dans de rares exceptions, l'utilisation de RTX mène donc à une déplétion importante et complète de la population de LB, incluant les LB auto-réactifs anti-Dsg1 et/ou anti-Dsg3, et leur réapparition ne survient pas avant 6 à 12 mois suivant le traitement.

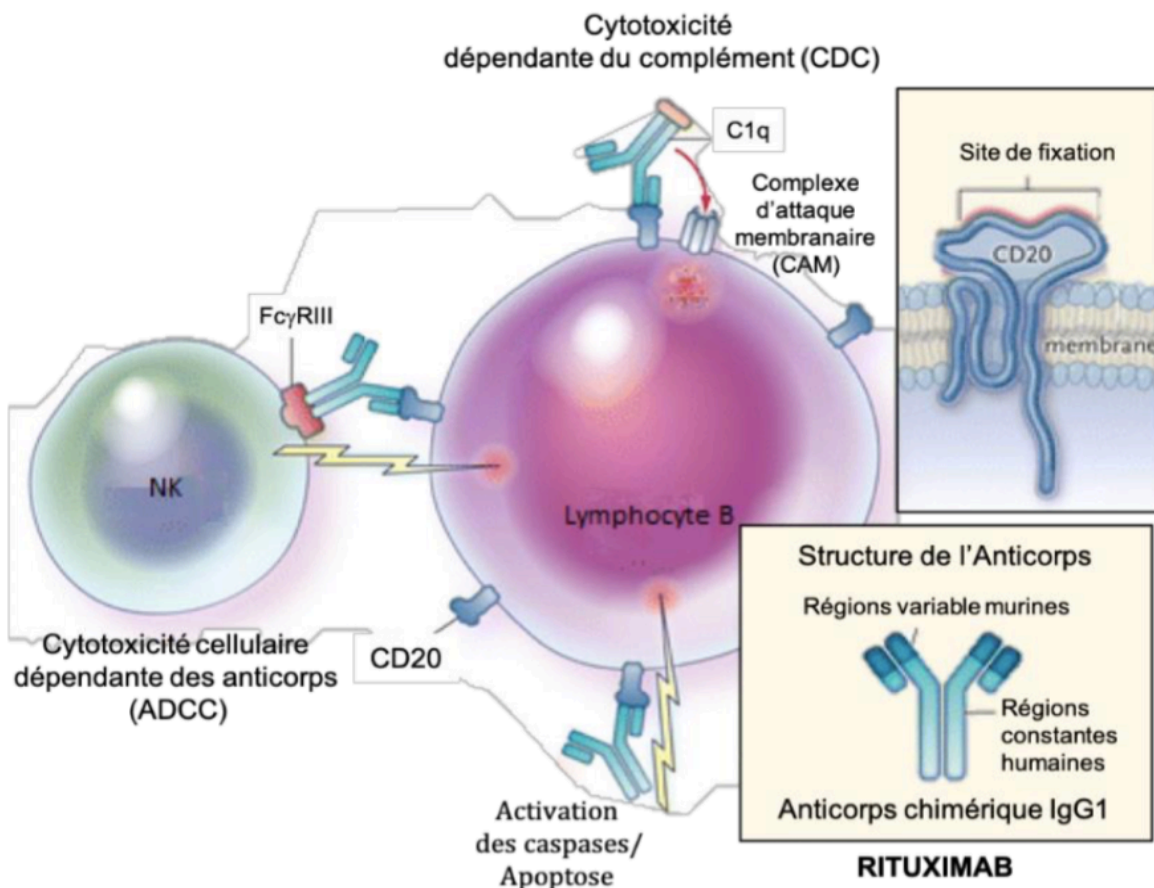


Figure 10. – Mécanismes d'action du rituximab (adaptée de Maloney *et al.*, 2012)

### **4.1.3 Résistance au rituximab**

Quelques mécanismes à l'origine d'une diminution de l'efficacité du RTX ont été décrits et incluent le développement d'anticorps anti-rituximab (ARA), le polymorphisme du récepteur FcγRIIIa, la présence d'inhibiteurs du complément et la diminution de l'expression cellulaire du CD20 ou la présence de cibles circulantes du CD20. Les ARA seront spécifiquement abordés.

#### **4.1.3.1 Les anticorps anti-rituximab**

Le risque de développer des ARA est documenté dans plusieurs pathologies auto-immunes, soit contre le fragment Fab murin ou contre le fragment Fc de la molécule. En effet, ce même phénomène est bien observé avec l'infliximab, un Acm chimérique murin-humain ayant pour cible le facteur de nécrose tumorale, et entre autres utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin, la PAR ou le psoriasis [192]. La présence d'Ac peut diminuer l'efficacité du traitement et mener à une perte de la réponse thérapeutique [193].

Le développement d'ARA est décrit chez un peu plus de 10% des patients atteints de PAR traités par RTX [194, 195], en plus des patients avec neuromyéélite optique [196], sclérose en plaque [197] et néphropathie membraneuse [198]. Les ARA ont été associés à un faible niveau sérique de RTX circulant [199], et à une déplétion incomplète des LB menant à une perte de la rémission clinique [198, 200, 201]. Tout récemment, Oomen *et al.* ont décrit une cohorte de 26 patients pédiatriques traités par RTX pour diverses pathologies auto-immunes, dont 23% (6/26) ayant développé des ARA. Aucun de ces 6 patients avait un taux de RTX sérique détectable et 5/6 de ces patients ont présenté une déplétion incomplète de leurs LB circulants. Ces Ac sont très rarement vus chez les patients en oncologie, potentiellement en raison de l'utilisation d'un régime de traitement différent ou de l'absence de prédispositions génétiques à l'auto-immunité.

En ce qui a trait au pemphigus, une seule petite cohorte de 11 patients atteints de formes sévères a été rapportée par Schmidt *et al.* en 2009 [202]. Deux patients (18%) ont développé des ARA et ont présenté une rémission incomplète (RI) suite au traitement par RTX. Une augmentation du taux sérique d'ARA a été corrélée avec la détérioration clinique. Par contre, aucun autre paramètre biologique n'a été suivi, et il est donc difficile d'attribuer avec

certitude l'absence de réponse de ces patients aux ARA. Plus récemment, l'étude PEMPHIX publiée dans le *New England Journal of Medicine* a rapporté une prévalence de 32% d'ARA parmi les 62 patients avec pemphigus traités par RTX (NCT02383589). Lunardon *et al.* ont rapporté une autre patiente ayant développé des ARA suite à son premier cycle de RTX. Celle-ci a présenté une rechute clinique 24 mois suivant la perfusion initiale, et a ensuite obtenue une réponse incomplète suite au re-traitement avec RTX [203]. Il s'agit d'ailleurs de la seule étude en pemphigus qui a spécifiquement démontré la capacité des ARA isolés du sérum de la patiente à inhiber la liaison du RTX au CD20. En effet, le mécanisme d'action des ARA inclut l'inhibition de la liaison avec le CD20, soit des Ac pouvant être plus spécifiquement nommés anticorps anti-chimérique humain (HACA), mais il y a aussi la possibilité de favoriser la formation de complexes immuns permettant d'accélérer la clairance du RTX, ou finalement d'inhiber la fonction de CDC en se liant au fragment Fc du RTX. Jusqu'à maintenant, peu d'informations quant à la réelle prévalence des ARA chez les patients atteints de pemphigus et leur impact sur le taux de rémission clinique ou de rechute sont disponibles.

#### **4.1.3.2 Polymorphisme du FCGR3A**

Le FCGR3A est le gène codant pour le récepteur FcγRIIIa qui se lie au fragment Fc des IgG, particulièrement les IgG1 et IgG3, et qui est présent à la surface des cellules NK [165]. Un polymorphisme a été décrit avec la présence de variantes homozygotes 158VV, donnant une haute affinité, ou 158FF, ayant une faible affinité de liaison, en plus des hétérozygotes 158VF [204]. Jusqu'à 44% des patients atteints de LED seraient porteur de la variante 158FF conduisant à une diminution de l'ADCC par le RTX [205, 206]. Les patients porteurs de cette variante de faible affinité peuvent avoir besoin d'une dose jusqu'à 10 fois plus élevée pour obtenir le même niveau de déplétion des LB [207]. Ceci n'a toutefois jamais été étudié dans le contexte de pemphigus, et la présence de ce polymorphisme ne corrèle pas toujours avec une diminution de l'efficacité du RTX [208, 209].

## **CHAPITRE 2 – OBJECTIFS DE TRAVAIL**

Ce projet a été divisé en 3 volets distincts qui s'inscrivent dans un grand objectif de procéder au suivi immunologique longitudinal des patients atteints de pemphigus inclus dans l'étude RITUX3 publiée dans le *Lancet* en 2017 [186].

### **PARTIE 1 : Caractérisation des sous-classes d'immunoglobulines anti-desmogléine 3 chez les patients atteints de pemphigus**

Ce premier volet a pour objectif de décrire la diversité isotypique des Ac anti-Dsg3 et d'évaluer leur lien avec la sévérité et la survenue de rechute. Les objectifs sont :

- a) Déterminer la diversité des sous-classes d'IgG anti-Dsg3 (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et leur évolution dans le temps
- b) Établir un lien entre la diversité isotypique des Ac anti-Dsg3 et le statut clinique des patients et la survenue de rechutes
- b) Étudier la pathogénicité *in vitro* des sous-classes d'IgG associées

### **PARTIE 2 : Caractérisation des anticorps anti-desmocolline 3 intracellulaires chez les patients atteints de pemphigus**

Ce deuxième volet a pour objectif d'étudier la prévalence et la pathogénicité des Ac anti-Dsc3 chez les patients atteints de pemphigus, et plus spécifiquement dirigés contre la portion intracellulaire de la protéine. Les objectifs sont de :

- a) Mettre au point une méthode sensible pour la détection des Ac anti-Dsc3
- b) Déterminer la prévalence des IgG et IgA anti-Dsc3 intracellulaires chez les patients atteints de pemphigus



c) Caractériser la pathogénicité *in vitro* des Ac anti-Dsc3 dirigés contre la portion intracellulaire

### **PARTIE 3 : Caractérisation des anticorps anti-rituximab et leur impact dans le traitement des patients atteints de pemphigus**

Ce troisième et dernier volet se concentre sur le développement des ARA chez les patients atteints de pemphigus ayant été traités par RTX en première intention. Les objectifs sont de :

- a) Déterminer la prévalence des ARA chez les patients atteints de pemphigus
- b) Évaluer leur impact clinique sur le taux de rémission complète et sur le taux de rechute à long terme (après 12 mois de traitement)
- c) Évaluer l'impact des ARA sur le profil biologique des patients au niveau de :
  - i. Taux sérique de RTX libre
  - ii. Déplétion des lymphocytes B CD19<sup>+</sup>
  - iii. Taux sérique des Ac anti-Dsg3

## CHAPITRE 3 – ARTICLE 1

### Avant-propos

Les Ac anti-Dsg sont au centre de la pathogénèse du pemphigus, et leur présence et pathogénicité ont bien été étudiées jusqu'à maintenant. L'évolution des titres d'Ac anti-Dsg par ELISA est justement un biomarqueur important pour suivre la réponse clinique des patients aux traitements et prédire les risques de rechutes. Les taux sériques d'Ac anti-Dsg1 sont relativement spécifiques, mais certains patients demeurent toutefois avec des taux élevés d'anti-Dsg3 malgré une rémission clinique complète. Il a été démontré que les IgG4 anti-Dsg3 sont particulièrement associés à une maladie active, alors que des patients en rémission auraient une plus grande proportion d'IgG1 anti-Dsg3, mais le réel impact et la cinétique de la diversité isotypique des Ac anti-Dsg3 chez les patients atteints de pemphigus restent peu connus à ce jour.

Cet article présente l'étude de la diversité des isotypes d'IgG anti-Dsg3 dans une cohorte de 65 patients atteints de PV, à savoir les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Nous avons développé un test par *Addressable Laser Bead Immunoassay* (ALBIA) pour mesurer les taux sériques et suivre l'évolution après traitement par RTX ou CS. Nous avons étudié le lien entre cette diversité isotypique et le statut clinique des patients et la survenue de rechute. Nous avons finalement évalué spécifiquement la pathogénicité *in vitro* des Ac anti-Dsg3 de type IgG3 par test de dissociation à la dispase et par immunofluorescence.

### Nouveautés et messages-clés

- Une méthode de détection sensible par ALBIA a été mise au point pour mesurer les taux d'Ac anti-Dsg3
- La présence de  $\geq 3$  sous-classes d'Ac anti-Dsg3, et particulièrement les IgG3 anti-Dsg3, est associée à un risqué significatif de rechute
- La pathogénicité *in vitro* des IgG3 anti-Dsg3 a été démontrée pour la première fois

- Lorsqu'il y a persistance d'Ac anti-Dsg3, les patients en rémission complète ont généralement 1 seule sous-classe, comparativement aux patients en maladie active qui ont au moins 2 sous-classes d'anti-Dsg3

### **Contribution de l'étudiant**

Pour cet article, j'ai réalisé une proportion des manipulations en laboratoire, soit une bonne partie des dosages des sous-classes d'Ac anti-Dsg3 (IgG totaux, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) par ALBIA (Figure 2, 3 et 4), la purification des IgG par chromatographie d'affinité sur ÄKTA-Start et les tests de pathogénicité *in vitro* par test de dissociation à la dispase et par immunofluorescence (Figure 5).

J'ai participé à la compilation des résultats et l'analyse des données, et contribué activement à l'écriture de l'article ci-joint. Cet **article original** a été soumis pour publication dans le *Frontiers in Immunology*.

# **The Diversity of Serum Anti-DSG3 IgG Subclasses Has a Major Impact On Pemphigus Activity and May Be Predictive of Relapses After Treatment With Rituximab.**

Marie-Laure Golinski<sup>1</sup>, **Alexandre Lemieux**<sup>2</sup>, Maud Maho-Vaillant<sup>1</sup>, Laurent Drouot<sup>3</sup>, Marie Petit<sup>3</sup>, Mickael Hertl<sup>5</sup>, Olivier Boyer<sup>6</sup>, Sébastien Calbo<sup>3</sup>, Pascal Joly<sup>1</sup>, Vivien Hébert<sup>1</sup>

1: Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, CHU Rouen, Department of Dermatology, F-76000 Rouen, France

2: Department of Dermatology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, F-76000 Rouen, France

3: Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, F-76000 Rouen, France

4: Normandie Univ, UNIROUEN, PRIMACEN, F-76000 Rouen, France

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

6: Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, CHU Rouen, Department of Immunology, F-76000 Rouen, France

## **Corresponding author:**

Vivien Hébert.

UFR Santé, Université de Rouen - INSERM U1234

22 boulevard Gambetta

76183, Rouen Cedex

Tél : +33 2 35 14 83 49

Email: Vivien.hebert@chu-rouen.fr

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

## **Abstract**

Introduction: We studied the distribution and *in vitro* pathogenicity of anti-DSG3 IgG subclasses during the course of pemphigus vulgaris (PV).

Methods: We longitudinally studied the distribution of anti-DSG3 IgG subclasses (before *versus* after treatment) in sera from PV patients, using an Addressable-Laser-Bead-ImmunoAssay (ALBIA). The *in vitro* pathogenicity of corresponding sera was tested using keratinocyte dissociation and immunofluorescence assays.

Results: Sixty-five sera were assessed at baseline (33 from patients treated with rituximab (RTX) and 32 with corticosteroids (CS)). Sixty-three percent of these baseline sera contained 2 or more anti-DSG3 IgG subclasses versus 35.7% of sera from patients in CR and 75.0% of sera from patients with persistent disease activity after treatment. IgG4 was the most frequently detected anti-DSG3 IgG subclass, both in patients with disease activity and in those in CR.

The presence of three or more anti-DSG3 IgG subclasses was predictive of relapse, in particular when it included IgG3, with a positive-predictive-value of 62.5% and a negative-predictive-value of 92%. While anti-DSG3 IgG4 Abs from sera collected before treatment were most often pathogenic, anti-DSG3 IgG4 from sera collected after treatment were pathogenic only after adjusting their titre to the one measured before treatment. Anti-DSG3 IgG3 Abs also had an *in vitro* pathogenic effect. The disappearance of the pathogenic effect of some sera after removal of anti-DSG3 IgG3 suggested an additional effect of this IgG subclass.

Conclusion: The serum levels and number of anti-DSG3 IgG subclasses drive the pathogenic effect of pemphigus sera, and may predict the occurrence of relapses.

## Introduction

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

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

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

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

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

## **Patients and methods**

### Population of patients

We analyzed the sera from 33 and 32 PV patients assigned to the rituximab (RTX) and standard corticosteroids (CS) arms of the Ritux 3 trial, respectively (23). The longitudinal analysis was performed in 33 of these 65 PV patients (16 treated with RTX and 17 treated with CS) corresponding to those who had persistent anti-DSG3 Abs during the course of their disease as measured using the Euroimmun ELISA assay, whether or not they relapsed. Additionally, sera from 36 healthy donors (HD), 6 PF, 9 bullous pemphigoid (BP) and 5 PV patients with negative anti-DSG3 Abs after RTX treatment were used as negative controls.

### Determination of the IgG subclasses of serum anti-DSG3 Abs

Sera from patients were analyzed before treatment at baseline, after treatment, and at the time of relapse, if applicable. To detect and quantify anti-DSG3 Ab IgG subclasses, we developed an ALBIA-DSG3, which consisted of coupling human recombinant DSG3 protein to fluorescent beads (LiquiChip Ni-NTA Beads; Qiagen) according to the manufacturer's protocol. To determine the isotype of serum anti-DSG3 Abs, DSG3-coated beads were incubated with sera diluted at 1:150, then incubated with anti-IgG1 (1:125), anti-IgG2 (1:125), anti-IgG3 (1:200) or anti-IgG4 (1:200) biotinylated secondary antibody (SouthernBiotech), and finally with streptavidin-R-phycoerythrin (Qiagen). The mean fluorescence intensity (MFI) was determined on a Bio-Plex apparatus using Manager software version 4.0 (Bio-Rad). Negative control with no serum and positive control [anti-DSG3 Calibrator of ELISA kit (Euroimmun)] were included in every assay. The anti-DSG3 Ab serum levels were determined with the following formula:



$(\text{MFI}^{\text{serum}}/\text{MFI}^{\text{Calibrator}}) \times 100$ , in which the calibrator was the anti-DSG3 positive control previously mentioned that was used on every 96-well plate and set arbitrarily to 100 arbitrary units (AU). For each isotype, we considered a positivity threshold corresponding to + 3 standard deviations relative to the mean value obtained from the sera of 36 HD.

#### IgG purification with ÄKTA-Start

Purification of IgG was performed by affinity chromatography, using ÄKTA-Start. The HiTrap protein G column (GE Healthcare) was equilibrated with 10 mL of Phosphate buffer saline (PBS) 1X, at pH 7.4. The 1/5 pre-diluted sera were added and IgG were eluted using glycine buffer 0.1M, pH 2.7, followed by neutralization with 1M Tris pH 9. Analyses were performed using UNICORN 7.0 software to collect IgG-containing fractions. Purified IgG were quantified using BCA protein assay kit (Pierce™) according to the manufacturer's instructions.

#### Keratinocyte Dissociation Assay

HaCaT cells were cultivated in 24-well-plates with DMEM + GlutaMAX (Gibco) containing 1mM CaCl<sub>2</sub> in a humidified and controlled atmosphere (5% CO<sub>2</sub>) at 37°C. Twenty-four hours after reaching confluency, positive control AK23 (10 µg/mL), HD IgG (62.5 µg/mL), PV IgG (62.5 µg/mL) or IgG-depleted fractions collected from IgG-specific affinity purification (62.5 µg/mL) were added and incubated for 24 hours. The amount of IgG was adjusted by a rule of three for the level of anti-DSG3 Abs in some patients. Subsequently, the cells were treated with dispase solution (2.4 U/ml; Sigma-Aldrich) at 37°C until monolayers were released from plates. Monolayers were stained with crystal violet (Sigma-Aldrich) and subjected to mechanical stress

by vigorously pipetting 7 times with a 1 mL pipette. Cell fragments were fixed, photos were taken from each well and cell fragments were counted manually. All experiments were performed in triplicate.

### Immunofluorescence assays

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

### Statistical analyses

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

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

## **Results**

### ***Patients and times of serological assessment (Figure 1)***

Out of the 90 patients of the Ritux 3 trial, 18 patients with PF were excluded, as well as 7 PV patients whose sera were not available. Thus, sera from 65 patients were tested at baseline (33 treated with RTX and 32 treated with CS) (Figure 1). A relapse occurred in 7 of 33 (21.2%) patients treated with RTX and in 20 of 32 (62.5%) treated with CS. The 7 patients who relapsed in the RTX group relapsed before Month 12 and were retreated with additional infusions of RTX. All of them were in complete remission (CR) at the Month 36 evaluation.

The distribution of anti-DSG3 IgG subclasses after treatment was performed in 2 subgroups of patients: i) those who relapsed or had persistent disease activity, and ii) those who had a sustained CR. These latter patients were selected from the whole group of patients in CR after treatment on the fact that they had persistent positive serum anti-DSG3 Abs by ELISA, allowing to assess the distribution of anti-DSG Abs after treatment. Seventeen patients had a persistent disease activity after treatment, including the 7 patients who relapsed early after RTX, and 10 out of the 20 patients who relapsed after CS treatment. The same serological analyses were performed at Month 36 after the start of treatment in 16 patients in sustained CR, including 7 treated with CS and 9 with RTX.

### ***Validation of the anti-DSG3 ALBIA test***

We first assessed the specificity and sensitivity of our ALBIA for the detection of anti-DSG3 IgG subclasses. For this, we compared anti-DSG3 ALBIA performed with anti-DSG3 Abs

containing sera from 65 PV patients with 56 control sera (36 HD, 6 PF, 5 PV with negative anti-DSG3 Abs after RTX treatment, and 9 BP). Our ALBIA had 92.31% sensitivity and 85.71% specificity for the detection of anti-DSG3 Abs (Data not shown).

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

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

At baseline, anti-DSG3 IgG4 and IgG1 were detected in 90.8% and 40.0% of sera, respectively, whereas IgG2 and IgG3 were both detected in 26.2% of sera (Figure 3).

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

#### ***Evolution of the distribution of anti-DSG3 IgG subclasses after treatment***

Most sera (64.3%) from patients in CR contained only one anti-DSG3 IgG subclass (corresponding to IgG4 in all but one case), as compared with 25.0% of sera from patients with persistent disease activity, and 36.7% of baseline sera. In contrast, 35.7% of sera from patients

in CR contained at least 2 or more anti-DSG3 IgG subclasses, as compared with 75.0% of sera from patients with persistent active disease and 63.3% of baseline sera (data not shown).

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

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

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

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

Moreover, the occurrence of relapses was particularly frequent in patients whose baseline serum contained anti-DSG3 IgG3 Abs, since the baseline sera from 5 of the 7 relapsing patients (71.4%) contained anti-DSG3 IgG3 Abs versus 3 out of the 26 sera from non-relapsing patients (11.5%,  $p=0.004$ ) (Figures 4B and 4C). The distribution of the other anti-DSG3 IgG subclasses (IgG1, IgG2 and IgG4) were not associated with the occurrence of relapse ( $p>0.99$ ,  $p=0.39$  and  $p=0.58$ ).

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

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

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

In agreement with this observation, Figure 5B shows that a serum collected at baseline (containing 98.2 AU of anti-DSG3 IgG4 by ALBIA) induced a strong keratinocyte dissociation, whereas the serum from the same patient collected at the time of CR (containing 1.0 AU of anti-DSG3 IgG4) did not induce a keratinocyte dissociation anymore. Interestingly, this latter serum

recovered its pathogenic activity in keratinocyte dissociation assay after adjustment of the IgG4 level to the one at baseline (Figure 5B), suggesting that anti-DSG3 IgG4 were pathogenic but the amount of antibody was not sufficient to induce *in vitro* keratinocytes dissociation.

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

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



## Discussion

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

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

persistence of anti-DSG3 Abs in some patients in CR, and the poor specificity (between serum level and disease activity) of DSG3 ELISA assays (5,10).

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

In accordance with the high clinical activity of RTX compared to a standard CS regimen, we observed 1.6-fold decrease in the mean number of anti-DSG3 IgG subclasses from 1.8 at the onset of disease to 1.1 in patients treated with RTX, whereas the number of anti-DSG3 IgG subclasses did not change much in patients treated with the standard CS regimen (1.9 versus 1.7).

As a result of these previous findings, we assessed whether the number of anti-DSG3 IgG subclasses and their isotypes in baseline sera might predict the occurrence of persistent disease activity or relapse under treatment. We observed that the mean number of anti-DSG3 IgG subclasses in the baseline sera was higher in patients who further relapsed than in patients who maintained a sustained remission ( $2.6 \pm 0.8$  vs  $1.5 \pm 0.9$ ;  $p=0.01$ ), corresponding to a positive predictive value of 62.5% and a negative predictive value of 92%. Interestingly, relapses were

particularly frequent in patients whose baseline serum contained anti-DSG3 IgG3 Abs, since anti-DSG3 IgG3 Abs were detected at baseline in sera from 71.4% of patients who further relapsed, as compared with 11.5% of patients who maintained CR ( $p=0.004$ ). In accordance with these findings, we showed that anti-DSG3 IgG3 Abs had an in vitro pathogenic effect, and that their removal from a baseline serum, which contained rather low level of anti-DSG3 IgG4, removed the pathogenic activity of this serum.

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

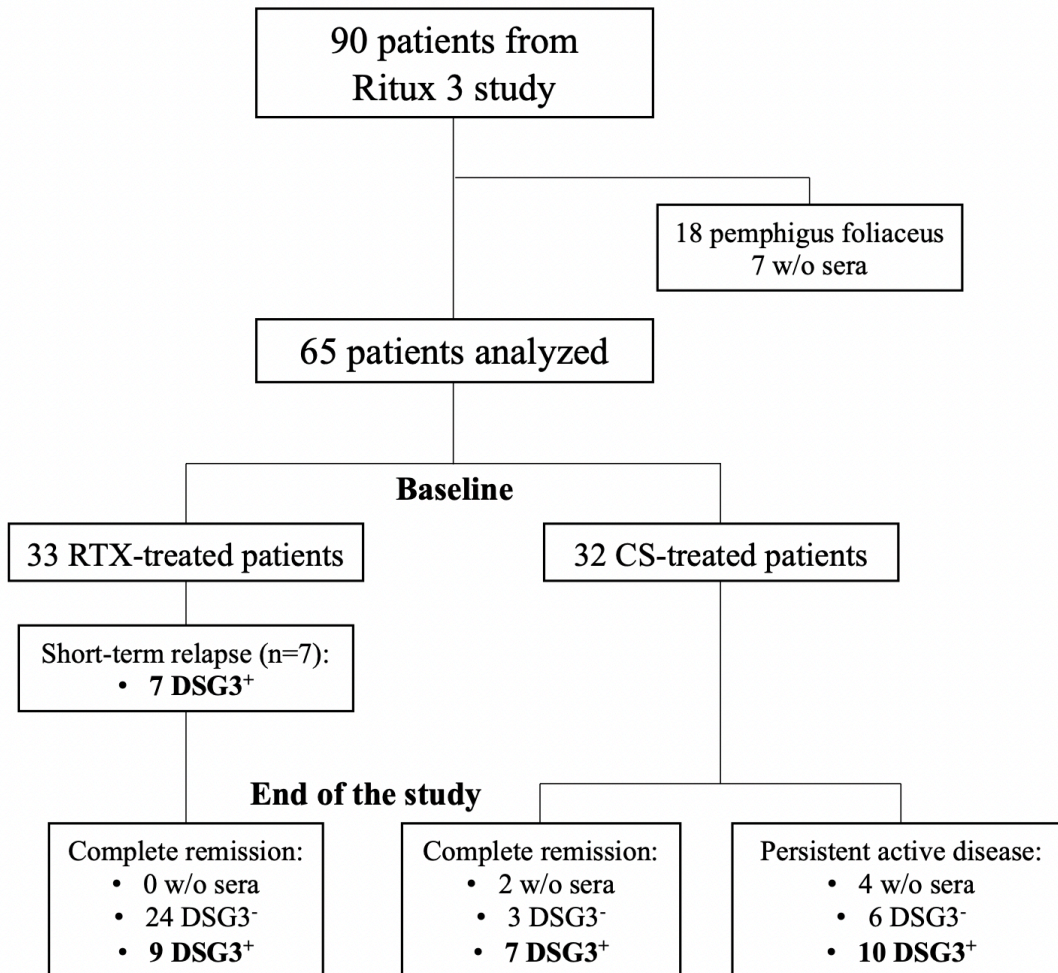
## References

1. Mascaró JM, España A, Liu Z, Ding X, Swartz SJ, Fairley JA, et al. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol.* oct 1997;85(1):90-6.
2. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol.* avr 2001;144(4):775-80.
3. Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard-Dahan C, Kern JS, Zambruno G, Feliciani C, et al. Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. *Br J Dermatol.* juill 2016;175(1):142-9.
4. Hébert V, Boulard C, Houivet E, Duvert Lehembre S, Borradori L, Della Torre R, et al. Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. *J Invest Dermatol.* 2019;139(1):31-7.
5. Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, Tron F, Grassi V, Musette P, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. *Arch Dermatol.* mai 2009;145(5):529-35.
6. Tovanabutra N, Bax CE, Feng R, Kushner CJ, Payne AS. Temporal outcomes after rituximab therapy for pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 25 oct 2021;S0022-202X(21)02292-2.
7. Bhol K, Mohimen A, Ahmed R. Correlation of Subclasses of IgG with Disease Activity in Pemphigus vulgaris. *Dermatology.* 1994;189(Suppl. 1):85-9.
8. Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, et al. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. *Br J Dermatol.* 2000;143(2):337-42.

9. Cho A, Caldara AL, Ran NA, Menne Z, Kauffman RC, Affer M, et al. Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. *Cell Rep.* 23 2019;28(4):909-922.e6.
10. Mignard C, Maho-Vaillant M, Golinski M-L, Balayé P, Prost-Squarcioni C, Houivet E, et al. Factors Associated With Short-term Relapse in Patients With Pemphigus Who Receive Rituximab as First-line Therapy: A Post Hoc Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 18 mars 2020;
11. Brooks WS, Lee Y-Y, Abell E, Deng J-S. Comparison of igg subclasses and complement binding activity of autoantibodies from patients with bullous pemphigoid and pemphigus. *J Clin Lab Anal.* 1989;3(5):307-11.
12. David M, Katzenelson V, Hazaz B, Ben-Chetrit A, Sandbank M. Determination of IgG subclasses in patients with pemphigus with active disease and in remission. *Arch Dermatol.* juin 1989;125(6):787-90.
13. Yamada H, Hashimoto T, Nishikawa T. IgG subclasses of intercellular and basement membrane zone antibodies: the relationship to the capability of complement fixation. *J Invest Dermatol.* avr 1989;92(4):585-7.
14. Jones CC, Hamilton RG, Jordon RE. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. *J Clin Immunol.* janv 1988;8(1):43-9.
15. Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Dermatol Sci.* mai 2001;26(1):55-61.
16. Tao MH, Smith RI, Morrison SL. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J Exp Med.* 1 août 1993;178(2):661-7.
17. Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med.* 1 juin 1989;320(22):1463-9.

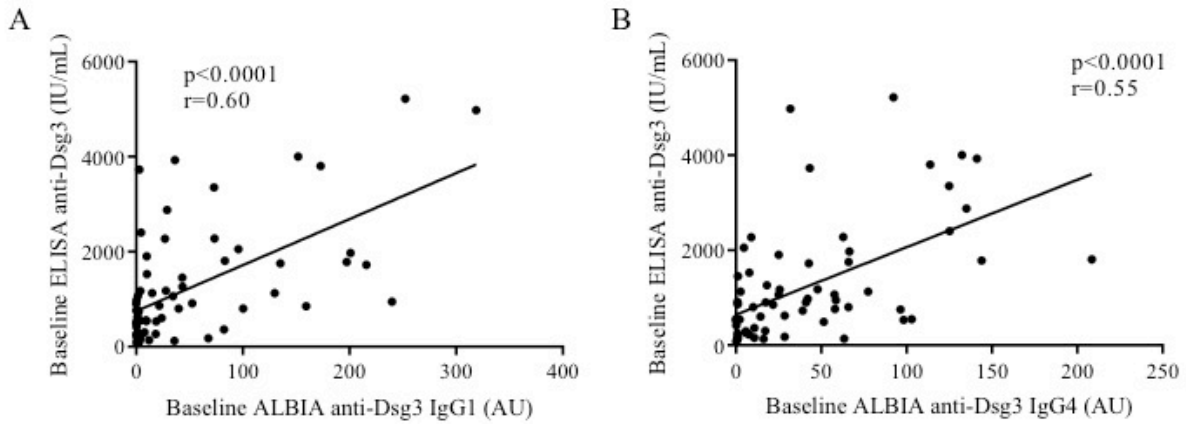
18. Funakoshi T, Lunardon L, Ellebrecht CT, Nagler AR, O'Leary CE, Payne AS. Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. *Br J Dermatol*. déc 2012;167(6):1245-53.
19. Lo AS, Mao X, Mukherjee EM, Ellebrecht CT, Yu X, Posner MR, et al. Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-Desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *PLoS ONE* [Internet]. 15 juin 2016 [cité 19 févr 2020];11(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909199/>
20. Ayatollahi M, Joubeh S, Mortazavi H, Jefferis R, Ghaderi A. IgG4 as the predominant autoantibody in sera from patients with active state of pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004;18(2):241-2.
21. Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Büdinger L, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*. juin 2001;144(6):1183-8.
22. Dhandha MM, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. *Autoimmunity*. nov 2012;45(7):516-26.
23. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 20 mai 2017;389(10083):2031-40.
24. Zhao WL, Ishii K, Egami S, Xu Z, Funakoshi T, Takahashi H, et al. Analysis of clinical characteristics, prognosis and antibody pathogenicity of pemphigus patients positive for anti-desmoglein IgG autoantibodies in remission: a retrospective cohort study. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 27 oct 2021;

## Figures



**Figure 1: Flow chart of the study.**

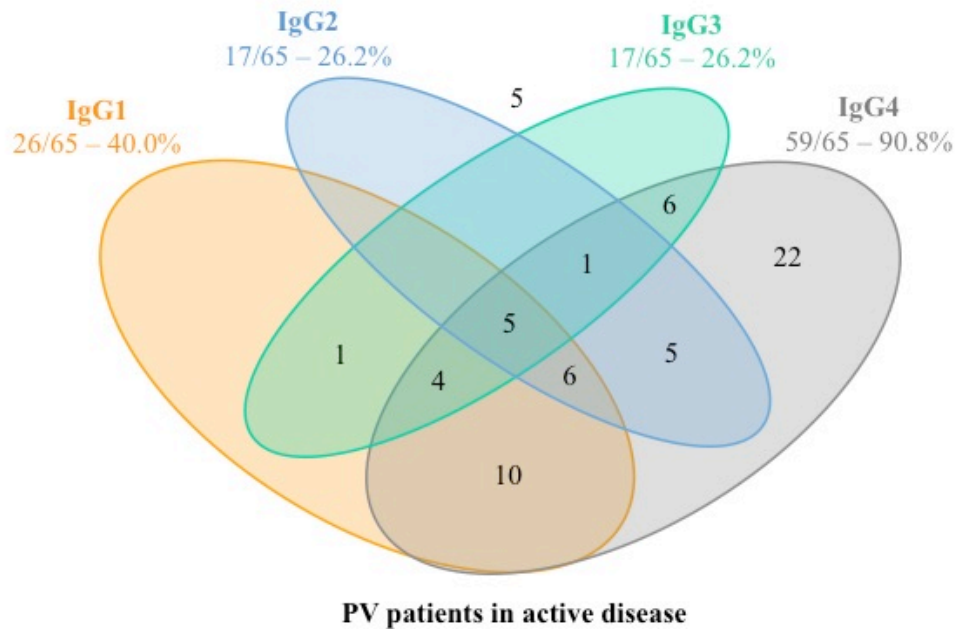
CS, corticosteroids; DSG3, desmoglein 3; RTX, rituximab



**Figure 2: Specificity of ALBIA test in comparison with ELISA anti-Dsg3 results in pemphigus patients at baseline (n=65).**

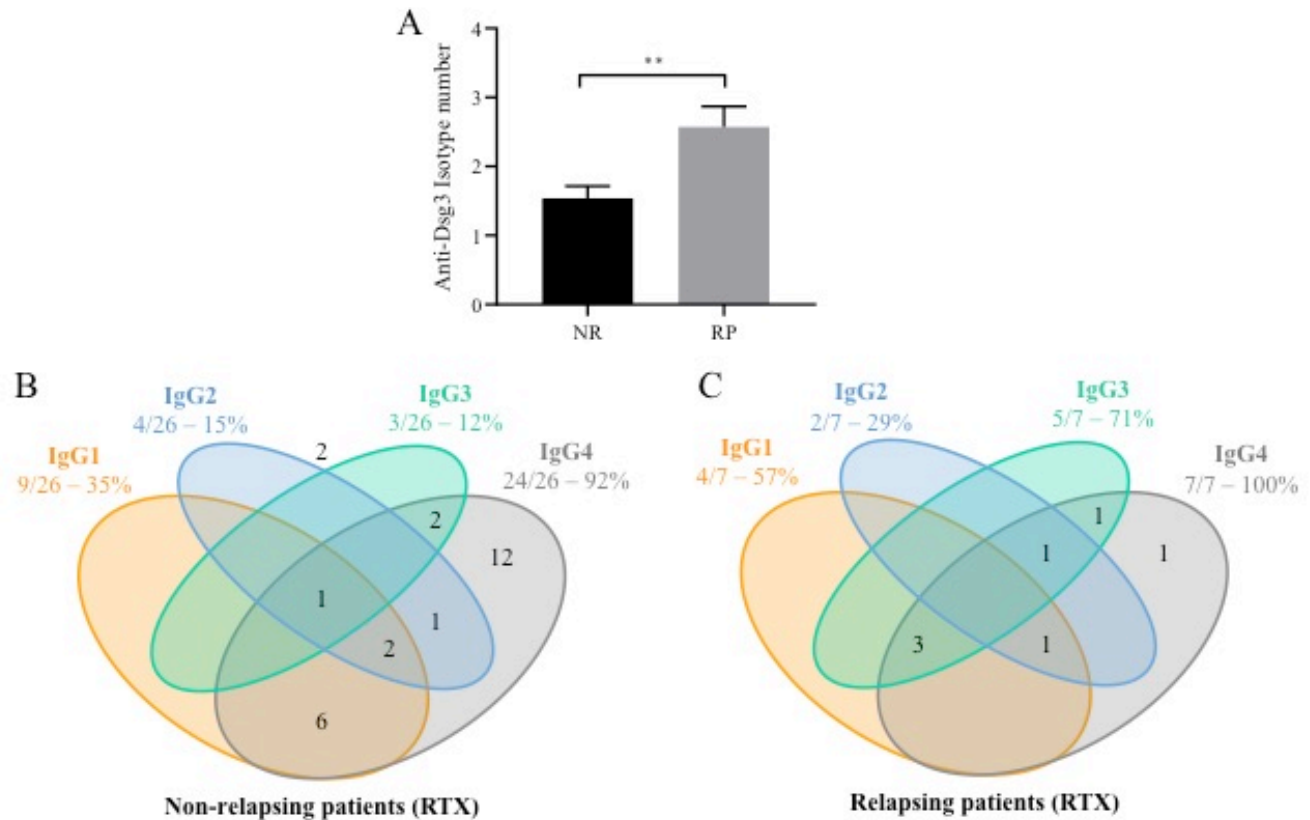
Correlation between ELISA anti-Dsg3 IgG and ALBIA anti-Dsg3 IgG1 (A) or IgG4 (B) values was assessed using Pearson's rank correlation coefficient.

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



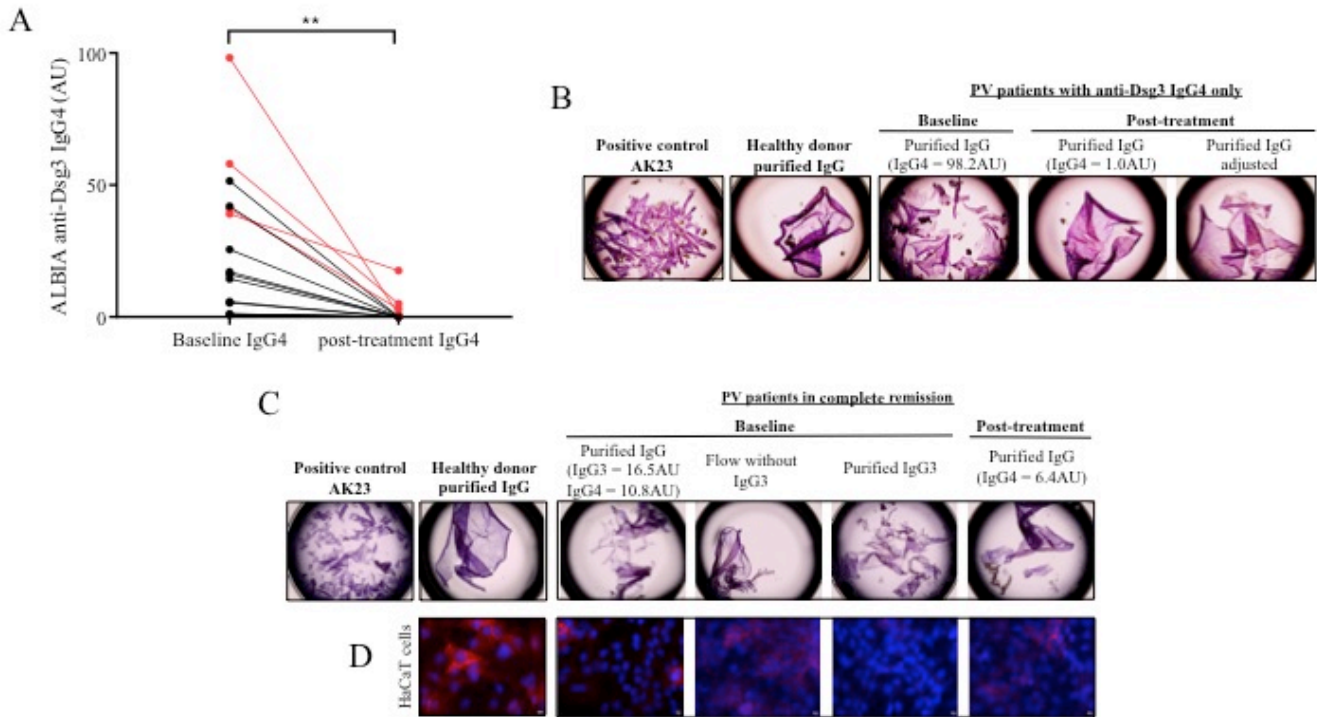
**Figure 3: Baseline repartition of anti-desmoglein 3 IgG subclasses in pemphigus vulgaris patients** Distribution of anti-Dsg3 IgG subclasses in the 65 PV patients in active disease. Five out of 65 patients in active disease were negative for each of the anti-Dsg3 IgG subclasses (number shown outside).





**Figure 4: The number of anti-desmoglein (Dsg) 3 IgG subclasses as well as the presence of anti-Dsg3 IgG3 in pemphigus vulgaris (PV) patients at baseline are associated with early relapse after rituximab (RTX) treatment.**

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



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

(A) IgG4 anti-Dsg3 level (AU) were significantly decreased after remission (in RTX and CS groups) in pemphigus patients who had IgG4 only at baseline (n=16) ( $p < 0.01$ ). The four patients who still contained anti-DSG3 IgG4 after treatment are identified in red. Mean were compared using paired t-test. HaCaT cells pre-incubated for 24h with positive control (AK23) or purified IgG of healthy donor (negative control) or PV patients with anti-Dsg3 IgG4 only (B) or anti-Dsg3 IgG3 and IgG4 (C) were dissociated from the plate with dispase and the monolayers were mechanically disrupted. (D) HaCaT keratinocytes immunostaining incubated with healthy donor IgG shows that Dsg3 (red) is localised at the plasma membrane.

## CHAPITRE 4 – ARTICLE 2

### Avant-propos

Jusqu'à maintenant, le rôle primordial des Ac anti-Dsg3 a bien été démontré dans la pathogénèse du pemphigus. Nous avons aussi démontré dans la section précédente l'importance de leur diversité isotypique dans le statut et l'évolution clinique des patients. Tel que présenté à la section 3.4.1, la présence d'Ac anti-Dsc3 ciblant la portion extracellulaire a été démontrée dans certains pemphigus, tels que le pemphigus végétant, le pemphigus herpétiforme ou le PPN, mais que très rarement dans les cas de PV et PF. Une récente étude s'est intéressée à la pathogénicité des Ac anti-Dsc3 ciblant une portion intracellulaire et a démontré pour la première fois son potentiel pathogène en synergie avec 2 autres Ac non-spécifique à la Dsg [127]. La réelle prévalence de ces Ac chez les patients atteints de pemphigus et leur rôle dans la pathogénèse ne sont toutefois que très peu compris comparativement aux cibles extracellulaires mieux décrites jusqu'à maintenant.

Cet article présente l'étude de la prévalence des Ac de type IgG et IgA ciblant la portion intracellulaire de la Dsc3 dans une cohorte de 146 patients atteints de PV et PF. Nous avons mis au point un test ALBIA pour détecter ces Ac, suivi leurs taux sériques dans le temps jusqu'à 60 mois suivant l'introduction d'un traitement, et étudier leur pathogénèse *in vitro* à partir de sérums de patients, ainsi que de souris immunisées avec la portion intracellulaire de la Dsc3 recombinante humaine.

### Nouveautés et messages-clés

- Une méthode de détection sensible par ALBIA a été mise au point pour détecter la présence d'Ac anti-Dsc3
- Au total, 21% des patients présentent des Ac anti-Dsc3. Les IgA et les IgG ciblant la portion intracellulaire de la Dsc3 sont détectés chez 16% et 7% des patients atteints de pemphigus, respectivement.
- La pathogénicité *in vitro* des IgA anti-Dsc3 a été démontrée pour la première fois

- La présence d'Ac anti-Dsc3 permet d'expliquer une bonne proportion des patients qui présentent une discordance entre leur phénotype clinique et leur profil sérologique d'Ac anti-Dsg

### **Contribution de l'étudiant**

Pour cet article, j'ai réalisé la quasi totalité des manipulations en laboratoire (excluant seulement les manipulations d'immunisation des souris), soit la mise au point d'une méthode de détection des Ac anti-Dsc3 par ALBIA, l'analyse de tous les sérums de patients pour le dosage des IgG totaux, IgA1 et IgA2 anti-Dsc3, la purification des immunoglobulines par chromatographie d'affinité sur ÄKTA-Start et la réalisation des tests de pathogénicité *in vitro* par test de dissociation à la dispase. D'ailleurs, le développement de l'ALBIA pour la détection des Ac anti-Dsc3 a fait l'objet d'un dépôt de brevet international le 26 août 2021, pour lequel je suis l'inventeur principal (voir **Annexe 1**).

J'ai finalement compilé et analysé tous les résultats inclus, extrait les données cliniques des bases de données, procédé aux analyses statistiques, puis j'ai rédigé et révisé le présent article dans sa version finale soumis sous forme de **lettre de recherche** dans le *Journal of Investigative Dermatology*.

# Prevalence and Pathogenic Activity of Anti-Desmocollin 3 Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus

Alexandre Lemieux<sup>1,2</sup>, Vivien Hébert<sup>1,3</sup>, Maud Maho-Vaillant<sup>1,3</sup>, Fabienne Jouen<sup>4</sup>, Olivier Boyer<sup>4</sup>,  
Sébastien Calbo<sup>1</sup>, Pascal Joly<sup>1,3</sup> and Marie-Laure Golinski<sup>1,3</sup>

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

2: Department of Dermatology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

3: Rouen University Hospital, Department of Dermatology, Rouen, France

4: Rouen University Hospital, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France

## Corresponding author:

Alexandre Lemieux

Department of Medicine, Service of Dermatology, Centre Hospitalier de l'Université de  
Montréal

1000 rue Saint-Denis, Montréal, Québec, Canada

H2X 3J4

Phone number: +1-514-890-8000

E-mail: alexandre.lemieux.2@umontreal.ca

**Short title:** Anti-Desmocollin3 antibodies in pemphigus

**Abbreviations :** Addressable Laser Bead ImmunoAssay, ALBIA; Antibodies, Abs; Bullous Pemphigoid, BP; Complete Remission, CR; Day, D; Desmocollin, DSC; Desmoglein, DSG; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA; Healthy Donor, HD; Immunoglobulin, Ig; Mucous Membrane Pemphigoid, MMP; Pemphigus Disease Area Index, PDAI; Pemphigus Foliaceus, PF; Pemphigus Vulgaris, PV; Persistent Disease Activity, PDA; recombinant Desmocollin 3, rDSC3; Systemic Lupus Erythematosus, SLE.

Desmocollin (DSC) 3 is a calcium-dependent desmosomal cadherin which plays an essential role in cell-to-cell adhesion (Johnson *et al.*, 2014). Antibodies (Abs) against the extracellular portion DSC3 have demonstrated to be able to induce a suprabasilar cleavage in a human skin model (Spindler *et al.*, 2009). Anti-DSC3 immunoglobulin (Ig) G Abs have been occasionally detected in rare types of pemphigus, including pemphigus herpetiformis, pemphigus vegetans or paraneoplastic pemphigus (Mindorf *et al.*, 2017, Ishii *et al.*, 2015, Ohzono *et al.*, 2015).

The prevalence of anti-DSC3 IgG antibodies in pemphigus vulgaris (PV) or pemphigus foliaceus (PF) sera gave conflicting results. Up to now, Abs targeting the N-terminal extracellular domains of DSC3 were mostly studied, and frequencies range from 0% when using an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) with DSC3 produced in insect cells (Müller *et al.*, 2009) or by immunoblotting (Meltzanidou *et al.*, 2019), to 44% when using an ELISA performed with DSC3 produced in mammalian cells (Mao *et al.*, 2010) and a proteomic technique (Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2013). Also, anti-DSC3 IgA Abs have not been consistently detected in serum of patients with PV or PF by ELISA or by indirect immunofluorescence with DSC3 transfected cells (Mindorf *et al.*, 2017). At the moment, it is therefore debatable if Abs targeting the extracellular domain of DSC3 are relevant in the pathogenesis of pemphigus, but it may come from the lack of a sensitive method for their detection, combined with the wrong epitope.

However, more lately, Abs targeting the intracellular domain of DSC3 (AA 712-896) were shown to be pathogenic *in vivo* in combination with two other non-desmoglein (DSG) antibodies (Chernyavsky *et al.*, 2019). The relevance of this intracellular DSC3 epitope and how it may induce acantholysis is still unknown, however, the pathogenicity of Abs directed against intracytoplasmic epitopes has already been demonstrated in paraneoplastic pemphigus (anti-plakins Abs) (Nagata *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2009).

In the present report, we therefore evaluated the prevalence and evolution of serum IgG and IgA Abs targeting the intracellular domain of DSC3 (AA 712-896) in a cohort of 146 patients

(115 PV and 31 PF), treated with or without rituximab, using a sensitive Addressable Laser Bead ImmunoAssay (ALBIA) test. We report clinical findings suggesting an *in vivo* pathogenic activity of intracellular anti-DSC3 Abs in PV and PF patients, which were confirmed in keratinocyte dissociation assays using patients' and immunized mice sera. The population of patients, the ALBIA test, the mice immunization and the keratinocyte dissociation assay are described in the Supplementary Materials and Methods.

In total, anti-DSC3 Abs were detected in 31 of 146 (21%) pemphigus sera, including 27 of 115 (23%) PV and 4 of 31 (13%) PF, compared to 5 of 100 (5%) healthy donors (HD) ( $P=0.0004$ ), and none of the sera from patients with bullous pemphigoid, mucous membrane pemphigoid and systemic lupus erythematosus. Two sera contained both IgG and IgA anti-DSC3 Abs. In total, ten (7%) sera contained anti-DSC3 IgG and 23 (16%) sera contained IgA Abs (Figure 1a, b and c). Anti-DSC3 IgG Abs were IgG1, 2, 3 and 4 in one, three, three and four cases, respectively (data not shown). Anti-DSC3 IgA Abs were IgA1 and IgA2 in 16 and 7 cases, respectively (Figure 1b and c). Eight sera which contained various titers of anti-DSC3 IgG or IgA Abs using ALBIA were tested by immunoblotting on epidermal extracts. Interestingly, only the one serum with the highest anti-DSC3 Ab values in ALBIA was positive in immunoblotting on epidermal extracts, confirming the high sensitivity of the ALBIA test (data not shown). Also, anti-DSC3 Abs detected in the 5 sera from HD were tested using immunoblotting on epidermal extracts, and no band was detected. The serum from one of these HD was finally tested in a keratinocyte dissociation assay and was shown to be non pathogenic, which confirmed these sera corresponded to false positive (Figure S1).

We did not observe a correlation between the baseline value of anti-DSC3 IgG Abs and the Pemphigus Disease Area Index (PDAI) clinical severity score ( $r=-0.11$ ), which might be related to the rather low number of sera containing anti-DSC3 Abs. However, we observed a decrease of anti-DSC3 IgG Abs in patients in complete remission from day (D) 0 to D90 ( $250\pm 174$  AU/mL vs  $85\pm 79$  AU/mL;  $P=0.09$ ) in comparison to those with a persistent disease activity ( $236\pm 182$  AU/mL vs  $227\pm 246$  AU/mL;  $P=0.96$ ) (Figure 1d). In contrast, serum anti-DSC3 IgA Abs

decreased at D90 above the positive cut-off value in all 23 patients, regardless of their clinical status (Figure 1e and 1f), which might argue for a different role of anti-DSC3 IgG and IgA Abs in the pathogenesis of the disease.

Then, we evaluated the *in vitro* pathogenicity of sera containing anti-DSC3 Abs depending on the serological profile of anti-desmoglein (DSG) 1 and anti-DSG3 Abs (Table 1). First, patient A had a mucosal type of PV with suprabasilar acantholysis despite the absence of anti-DSG1 and anti-DSG3 Abs. Anti-DSC3 IgA Abs from this patient's serum induced *in vitro* monolayer dissociation, which was significantly lowered following pre-adsorption with recombinant DSC3 (rDSC3) (Figure 1g).

Second, patients C, D and E had a mucocutaneous type of PV despite the exclusive presence of anti-DSG3 Abs (without anti-DSG1 Abs) (Table 1). Figure 1h shows that purified anti-DSC3 IgA and IgG Abs from these sera induced monolayer dissociation. The pathogenic activity of patients' purified anti-DSC3 IgA Abs was abolished after pre-adsorption of the IgA fraction with rDSC3 (patients D). Similarly, the *in vitro* pathogenicity of patients' purified IgG containing both anti-DSG3 and anti-DSC3 Abs was decreased when removing anti-DSC3 IgG Abs (patient E). Importantly, an ALBIA test was performed for anti-DSG3 Abs on the pre-adsorbed IgG fraction of this patient; It showed the persistence of these Abs following pre-adsorption with DSC3, which confirmed the direct contribution of anti-DSC3 Abs in the induction of acantholysis with this serum (Figure S2). This also suggests that the combination of both anti-DSG3 and anti-DSC3 Abs were necessary to induce an *in vitro* pathogenic effect with this serum.

Finally, three patients (F, G and H) had a cutaneous type of PV (without mucosal lesions) and suprabasilar acantholysis despite the presence of exclusive anti-DSG1 Abs (without anti-DSG3 Abs) (Table 1). Figure 1i shows that the pathogenic activity of anti-DSC3 IgA Abs was abolished by pre-adsorption of these sera with rDSC3.



These results were consistent with the distribution of DSC3 in the lower epidermis. Indeed, since HaCaT cells used for the dissociation tests do not express DSG1 (Figure S3), it is therefore likely that anti-DSC3 Abs which induced a dissociation of HaCaT monolayer *in vitro* might contribute in combination with anti-DSG1 Abs to the supra-basilar acantholysis observed in biopsies from these three patients with anti-DSG1 IgG and anti-DSC3 IgA Abs. A similar mechanism has been proposed to explain the occurrence of skin and mucosal lesions in patients with serum anti-DSG1 and anti-DSG3 Abs (Mahoney *et al.*, 1999). As mentioned, it is still unclear how intracellular antibodies might induce acantholysis, when compared to antibodies targeting the extracellular domain 1 or 2 of DSC3. Indeed, these extracellular portions were previously shown to create significant *trans* heterophilic interaction with DSG1 (Spindler *et al.*, 2009, Ishii *et al.*, 2020) and DSG3 (Harrison *et al.*, 2016). However, our data support the ability of Abs targeting an intracellular epitope to induce *in vitro* acantholysis by its own.

Out of the 91 patients for whom the clinical phenotype and level of epidermal cleavage were precisely recorded, a discordant serological profile of anti-DSG1 and anti-DSG3 was observed in 18 cases (20%). Interestingly, anti-DSC3 Abs were detected in 8 of these 18 sera (44%) as compared to 16 of 73 sera (21%) from patients with no discordance ( $P=0.05$ ). This suggests that the presence of anti-DSC3 Abs might help to explain the clinical findings in patients with a discordant anti-DSG1 and anti-DSG3 serological profile. The clinical phenotype, the level of epidermal cleavage in histology and the type of serum anti-DSG and anti-DSC3 Abs of these 8 patients are mentioned in Table 1.

To confirm the pathogenic activity of anti-DSC3 Abs, female C57BL/6 mice were immunized with human rDSC3 (Supplementary Materials and Methods). Anti-DSC3 IgG Abs were detected in mice sera 56 days after immunization (Figure 1j). Purified IgG from these anti-DSC3 Ab-containing sera induced a monolayer dissociation, while no pathogenic effect was observed with control sera from non-immunized mice (Figure 1k). Also, we performed a specific pre-adsorption of anti-DSC3 from the purified IgG fraction obtained from mice, and this preliminary data ( $n=1$ ) support its pathogenicity since the monolayer fragmentation was

abolished. These experiments further suggest the role of anti-DSC3 Abs in the pathogenesis of pemphigus.

Overall, this study has shown that the ALBIA test is a sensitive assay for the detection of anti-DSC3 IgG and IgA Abs in patients with PV or PF. The presence of anti-DSC3 Abs contributes to acantholysis and may partly explain the discordance observed in some PV patients between their clinical phenotype and their anti-DSG1 and anti-DSG3 Ab profile.

## References

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.

Drouot L, Allenbach Y, Jouen F, Charuel JL, Martinet J, Meyer A, et al. Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R39.

Harrison OJ, Brasch J, Lasso G, Katsamba PS, Ahlsen G, Honig B, et al. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:7160-5.

Ishii N, Teye K, Fukuda S, Uehara R, Hachiya T, Koga H, et al. Anti-desmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus. *Br J Dermatol* 2015;173:59-68.

Ishii K, Yoshida K, Stanley JR, Yamagami J, Amagai M, Ishiko A. Pemphigus Vulgaris and Follicular IgG Autoantibodies Directly Block Heterophilic Transinteraction between Desmoglein and Desmocollin. *J Invest Dermatol* 2020;140:1919-26.

Johnson JL, Najor NA, Green KJ. Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a015297.

Kalantari-Dehaghi M, Anhalt GJ, Camilleri MJ, Chernyavsky AI, Chun S, Felgner PL, et al. Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. *PloS one* 2013;8:e57587.

Li J, Bu D, Huang Y and Zhu X. Role of autoantibodies against the linker subdomains of envoplakin and periplakin in the pathogenesis of paraneoplastic pemphigus. *Chin Med J (Engl)* 2009;122:486-95.

Mahoney MG, Wang Z, Rothenberg 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.

Mao X, Nagler AR, Farber SA, Choi EJ, Jackson LH, Leiferman KM, et al. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *The American journal of pathology* 2010;177:2724-30.

Meltzanidou P, Patsatsi A, Kyriakou A, Vareli K, Lambropoulos A. Detection of IgG Autoantibodies against Desmocollin-3 in Greek Patients with Pemphigus. *Acta dermatovenerologica Croatica: ADC* 2019;27:8-10.

Mindorf S, Dettmann IM, Kruger S, Fuhrmann T, Rentzsch K, Karl I, et al. Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus. *Experimental dermatology* 2017;26:1267-70.

Müller R, Heber B, Hashimoto T, Messer G, Mullegger R, Niedermeier A, et al. Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus. *Clinical and experimental dermatology* 2009;34:898-903.

Nagata Y, Karashima T, M. Watt F, Salmhofer W, Kanzaki T and Hashimoto T. Paraneoplastic pemphigus sera react strongly with multiple epitopes on the various regions of envoplakin and periplakin, except for the c-terminal homologous domain of periplakin. *J Invest Dermatol* 2001;116:556-63.

Ohzono A, Sogame R, Li X, Teye K, Tsuchisaka A, Numata S, et al. Clinical and immunological findings in 104 cases of paraneoplastic pemphigus. *The British journal of dermatology* 2015;173:1447-52.

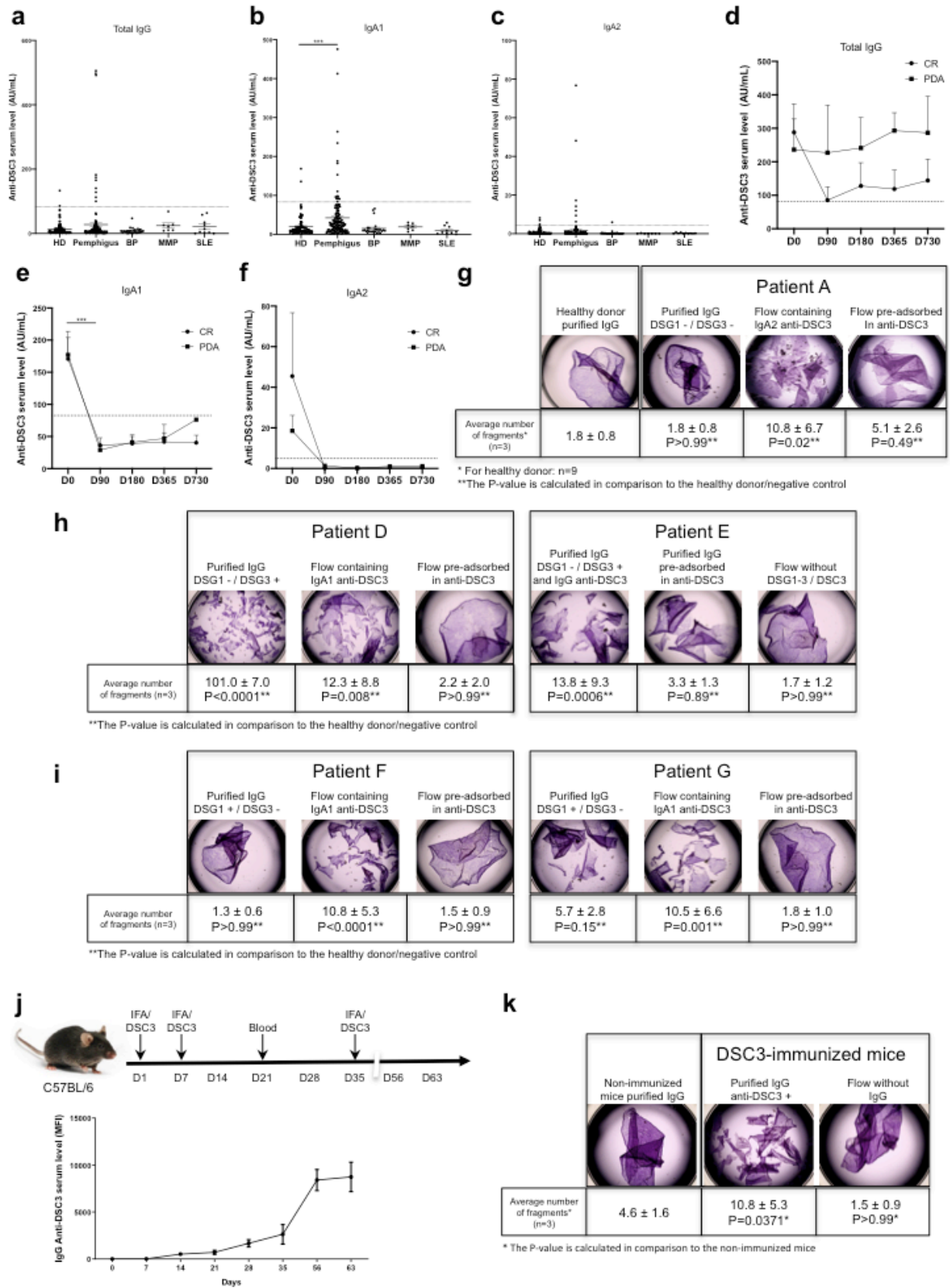
Spindler V, Heupel WM, Efthymiadis A, Schmidt E, Eming R, Rankl C, et al. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem* 2009;284:30556-64.

## Table

**Table 1.** Correlation of clinical phenotype, histology and serological profile in patients with anti-DSC3 antibodies

Patient	Clinical phenotype	Level of cleavage on histology	Anti-DSG1	Anti-DSG3	Anti-DSC3
A	Mucosal	Suprabasilar	-	-	IgA2
B	Mucocutaneous	Suprabasilar	+	-	IgA2
C	Mucocutaneous	Suprabasilar	-	+	IgA1 and IgA2
D	Mucocutaneous	Suprabasilar	-	+	IgA1
E	Mucocutaneous	Suprabasilar	-	+	IgG
F	Cutaneous	Suprabasilar	+	-	IgA1
G	Cutaneous	Suprabasilar	+	-	IgA1
H	Cutaneous	Suprabasilar	+	-	IgG

# Figures



**Figure 1. Detection and quantification of anti-desmocollin 3 antibodies in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus patients by an Addressable Laser Bead ImmunoAssay (ALBIA) test and evaluation of their *in vitro* pathogenicity.**

Anti-Desmocollin (DSC) 3 antibody (Abs) level in (a) total IgG, (b) IgA1 and (c) IgA2 in sera from patients with Pemphigus Vulgaris (PV) and Pemphigus Foliaceus (PF) (n=146; 115 PV and 31 PF) compared to sera from Healthy Donors (HD) (n=100), Bullous Pemphigoid (BP) (n=28), Mucous Membrane Pemphigoid (MMP) (n=7) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (n=10). Evolution of serum anti-DSC3 Abs from baseline up to Day (D) 730 depending on patients' clinical status: Complete Remission (CR) versus Persistent Disease Activity (PDA). Panel d: total IgG (CR, n=5; PDA, n=4); panel e: IgA1 (CR, n=11; PDA, n=5); panel f: IgA2 (CR, n=2; PDA, n=5). The cut-off values are indicated as horizontal dotted lines and determined by the mean + 3 standard deviation (SD) of HD. Mean values are shown as solid bars  $\pm$  Standard Error of Mean (SEM).

Panel g: keratinocyte dissoaciation assay from one patient containing solely anti-DSC3 IgA which shown to be pathogenic in the absence of anti-DSG1 and anti-DSG3. Panel h: keratinocyte dissociation assays using sera from two patients with mucocutaneous type of PV containing anti-DSG3 IgG and anti-DSC3 IgA1 (patient D), and anti-DSG3 and anti-DSC3 IgG (patient E). A decrease of the pathogenicity was observed after pre-adsorption of anti-DSC3 Abs. Panel i: The dissociation assay was performed with sera from two patients (F and G) who presented a cutaneous type of PV containing anti-DSG1 IgG and anti-DSC3 IgA1. A decrease of serum pathogenicity was observed after pre-adsorption of anti-DSC3 Abs with recombinant DSC3.

Mice were immunized with recombinant DSC3 protein and antibodies were detected as of day 56 (j). Purified IgG anti-DSC3 from immunized mice were shown to be pathogenic (k).

Data are expressed as mean,  $\pm$  SEM. Compared to HD: \* P < 0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P < 0.001.

AU, Arbitrary Unit; BP, Bullous Pemphigoid; D, Day; CR, Complete Remission; DSC3, Desmocollin 3; DSG, Desmoglein; HD, Healthy Donors; IFA, Imject incomplete Freund's Adjuvant; Ig, Immunoglobulin; MMP, Mucous Membrane Pemphigoid; PDA, Persistent Disease Activity; SLE, Systemic Lupus Erythematosus.

## **Supplementary material**

### **Supplementary Materials and Methods**

#### ***Serum samples***

Sera from 146 pemphigus patients including 115 pemphigus vulgaris and 31 pemphigus foliaceus were used. These sera were obtained from the approved trials RITUX3 (ClinicalTrials.gov number NCT00784589), RITUX-MMP (ClinicalTrials.gov number NCT03295383), Rituximab2 (ClinicalTrials.gov number NCT00525616) and Severity Scores (EudraCT: 2008-005266-31). They were all analyzed before treatment at Day (D) 0 for the prevalence of total IgG, IgA1 and IgA2 anti-desmoglein (DSC) 3 antibodies, and subclasses of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 in patients positive in total IgG. The longitudinal study was done at D90, D180, D365 and D730 after treatment. We also performed the test with sera from 28 patients with bullous pemphigoid, 7 with mucous membrane pemphigoid, and 10 with systemic lupus erythematosus. Sera from 100 healthy donors (HD) were used to establish the cut-off value. This value was determined as the mean + 3 standard deviation (SD) of the HD. The Pemphigus Disease Area Index was used to assess clinical severity at baseline.

#### ***Human recombinant desmoglein 3 protein***

The carboxy-terminal domain of human recombinant DSC3 (rDSC3) produced in insect cells with a baculovirus expression system and fused to a 6x-histidine tag was obtained from Antibodies-online, Aachen, Germany (ABIN3079072, AA 712-896), as previously reported (Chernyavsky, A., *et al.*, 2019).

#### ***Addressable Laser Bead ImmunoAssay test for the quantification of anti-desmoglein 3 antibodies (ALBIA-DSC3)***

To detect and quantify anti-DSC3 antibody isotypes, we developed an ALBIA-DSC3, which consisted of coupling human rDSC3 protein with fluorescent magnetic MagPlex<sup>®</sup>-COOH beads 055 using the Bio-Plex coupling kit (Biorad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol with a ratio of 20 µg of protein for 1 250 000 beads. Briefly, beads were first activated with the



activation buffer, and then incubated for 20 minutes with 10 µL of N-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS) 50 mg/mL (ThermoScientific) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) 50 mg/mL. Beads were then incubated with rDSC3 for 2 hours, blocked with the blocking buffer for 20 minutes and stored using the storage buffer at -20°C.

To quantify anti-DSC3 antibodies, 1000 DSC3-coated beads were incubated in Multiscreen 96-well plates with 100 µl of sera diluted at 1:37.5 in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) with  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  and 1% fetal bovine serum for 2 h on a plate shaker and then washed. Then, beads were incubated for 1 h in the same conditions with 100 µl of specific biotinylated mouse anti-human secondary antibodies (SouthernBiotech) at the following dilution: total IgG at 1:2000, IgG1, IgG2 and IgA1 at 1:125, and IgG3, IgG4 and IgA2 at 1:200, and washed. Finally, beads were incubated for 15 min with 50 µL of streptavidin-R-phycoerythrin (Biorad) diluted at 1:400. The mean fluorescence intensity (MFI) was determined on a Bio-Plex apparatus using Manager software version 4.0 (Bio-Rad). Negative control (no serum, secondary antibody only) and positive control (highly positive human anti-DSC3 antibody serum) were included in all assays.

The anti-DSC3 antibody level was determined with the following formula that was previously described:  $(\text{MFI}^{\text{Serum}}/\text{MFI}^{\text{Positive Control}}) \times 100$  (Drouot *et al.*, 2014), in which the positive control was a patient highly positive for anti-DSC3 antibodies that were used in all 96-well plates. The level was arbitrarily set to 100 arbitrary units (AU)/mL.

### ***Keratinocyte Dissociation Assay***

HaCaT cells were cultivated with 600 000 cells per well in 24-well-plates with DMEM + GlutaMAX (Gibco) containing 1mM  $\text{CaCl}_2$  in a humidified atmosphere (5%  $\text{CO}_2$ ) at 37°C. After reaching confluency in 24 h, positive control AK23 (10 µg/mL), 50 µg of HD or PV purified IgG or flow (Ig without IgG) or fractions pre-adsorbed in anti-DSC3 were added and incubated for 24 hours. For adsorption, purified IgG or flow diluted at 1:5 in DPBS were incubated twice for 2 h with 2500 DSC3-coated beads and washed. Subsequently, the cells were treated with dispase

solution (2.4 U/ml; Sigma) at 37°C until monolayers were released from plate. Monolayers were stained with crystal violet (Sigma Aldrich) and subjected to mechanical stress by vigorously pipetting 7 times with a 1mL pipette. Cell fragments were fixed and counted manually, and photos were taken of each well. All experiments were performed in triplicate.

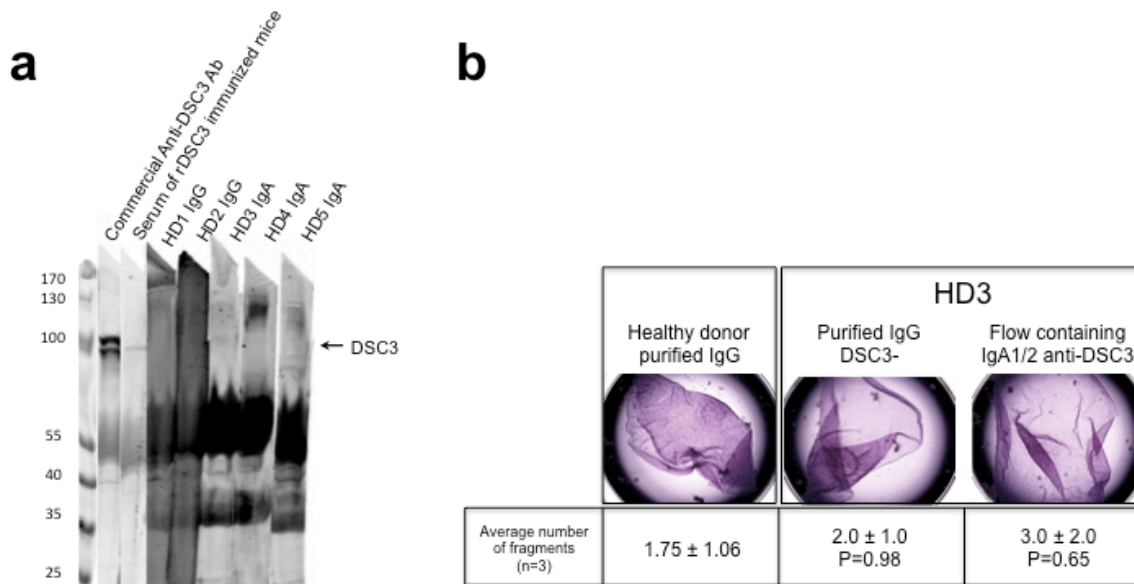
### ***Mouse immunization with human recombinant Desmocollin 3***

Eight-week-old female C57BL/6 mice were purchased from Janvier, France. The protocol for animal experimentation was approved by an institutional ethics committee (Comité régional d’Ethique en Expérimentation Animale, Mont Saint Aignan, France, protocol number 27457) were conducted according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Mice were immunized with subcutaneous injection of 10 µg of human rDSC3 (Antibodies online, Aachen, Germany) emulsified in Imject incomplete Freund's Adjuvant (IFA) (Thermo Scientific). Additional boosts were performed after 7 and 35 days using 10 µg rDSC3 plus IFA. The production of anti-DSC3 after immunization was assessed from mice serum by ALBIA, as previously described, except that anti-mouse IgG secondary Ab (Southern Biotech) was used for revelation. Pathogenicity of the newly formed IgG anti-DSC3 was evaluated with a keratinocyte dissociation essay.

### ***Statistical analysis***

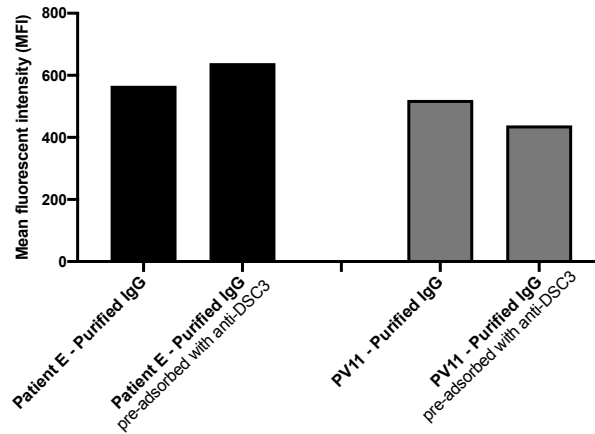
All statistical analyses were performed using GraphPad Prism V8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Comparisons were made using a paired or unpaired Student’s *t*-test and one-way ANOVA test, where appropriate. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## Supplemental figures



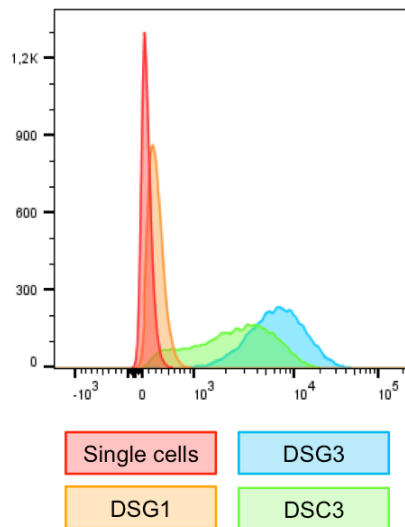
**Figure S1. Immunoblotting on epidermal extracts and keratinocyte dissociation assay using healthy donors' sera positive in ALBIA-DSC3**

By immunoblotting on epidermal extracts, none of the 5 sera from healthy donors, which were positive in the DSC3 ALBIA test, labelled the 100 kDa band corresponding to DSC3, while this band was recognized by sera from mice immunized with human recombinant DSC3 (Antibodies-online, ABIN3079072) as by a commercially available anti-DSC3 antibody used as positive control. (a). Purified IgG from the serum from a HD and the Flow (which contained anti-DSC3 IgA Abs in the ALBIA test) showed no pathogenic activity in the keratinocyte dissociation assay (b).



**Figure S2. Serum level of anti-Desmoglein 3 antibodies in the purified IgG portion measured by the mean fluorescent intensity with an ALBIA test**

Serum level of anti-DSG3 antibodies in Patient E in the purified IgG portion before and after the pre-adsorption with the DSC3-coupled magnetic beads showing the absence of a non specific depletion of the anti-DSG3 and the absence of a cross-reactivity. The specificity of the pre-adsorption was verified with PV11, a patient containing solely anti-DSG3 antibodies, who also showed the absence of a non-specific depletion of his anti-DSG3 antibodies before and after incubation with DSC3-coupled magnetic beads.



**Figure S3. Expression of desmoglein 1 (DSG1), desmoglein 3 (DSG3) and desmocollin 3 (DSC3) in HaCaT cells by flow cytometry**

Forward scatter histogram overlay for Single cells (red), DSG3 (blue), DSG1 (yellow) and DSC3 (green) showed the expression of DSG3 (blue) and DSC33 (green), but the absence of DSG1 (yellow) in the HaCaT cells used in the monolayer dissociation assay.

## CHAPITRE 5 – ARTICLE 3

### Avant-propos

Ce troisième et dernier volet se concentre sur l'aspect thérapeutique, plus précisément l'utilisation du RTX. Étant un Acm chimérique souris-humain, il existe un risque théorique de développer des Ac neutralisants avec son utilisation. Leur présence a été documentée dans les autres pathologies auto-immunes, telles que le LED ou la PAR. Toutefois, la prévalence d'ARA et leurs impacts clinico-biologiques n'ont jamais été clairement démontrés dans une population de patients atteints de pemphigus.

Pour cet article, nous avons étudié la prévalence d'ARA chez 42 patients traités par RTX parmi la cohorte RITUX3. Nous avons évalué l'effet des ARA sur l'atteinte d'une rémission complète et la survenue de rechutes tardives (après 12 mois). Nous avons aussi mesuré les taux sériques d'ARA, de RTX et d'Ac anti-Dsg3 et la proportion de LB CD19<sup>+</sup> à différents temps pour évaluer leurs impacts biologiques. Finalement, 5 patients traités par RTX et ayant rechutés ont été spécifiquement recrutés dans un deuxième temps pour confirmer nos données à la pratique clinique réelle et tenter d'expliquer leur rechute.

### Nouveautés et messages-clés

- Les ARA ne sont pas un phénomène rare, puisqu'ils sont détectés chez 31% des patients atteints de pemphigus dans la première année de traitement par RTX
- Les ARA n'affectent pas l'atteinte d'une rémission complète et ne sont pas une contre-indication à des perfusions subséquentes de RTX
- La présence d'ARA pourrait expliquer des rechutes tardives (après 12 mois) chez les rares patients chez qui le RTX devient inefficace, lorsque le taux de RTX libre est indétectable et que la déplétion des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> est incomplète

### **Contribution de l'étudiant**

Pour cet article, j'ai réalisé la majorité des manipulations en laboratoire, soit la mesure des taux sériques de RTX libre et d'ARA par méthode ELISA, puis la proportion de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> par cytométrie en flux.

J'ai finalement compilé et analysé tous les résultats inclus, extrait les données cliniques et biologiques des bases de données (incluant les taux sériques d'anti-Dsg3 qui avaient été mesuré avant mon arrivée au laboratoire), procédé aux analyses statistiques, puis j'ai rédigé et révisé le présent article dans sa version finale qui a été soumis sous forme d'**article court** dans le *JAMA Dermatology*.

# **Clinical Relevance and Biological Effects of Anti-rituximab Antibodies in Patients With Pemphigus**

## **Authors:**

**Alexandre Lemieux**<sup>1</sup>, Maud Maho-Vaillant<sup>2</sup>, Marie-Laure Golinski<sup>2</sup>, Vivien Hébert<sup>2</sup>, Olivier Boyer<sup>3</sup>, Sébastien Calbo<sup>2</sup>, Sophie Candon<sup>3</sup> and Pascal Joly<sup>2</sup>

## **Affiliations:**

<sup>1</sup>: Department of Dermatology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, CHU Rouen, Department of Immunology, F-76000 Rouen, France

<sup>2</sup>: Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, CHU Rouen, Department of Dermatology, F-76000 Rouen, France

<sup>3</sup>: Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, CHU Rouen, Department of Immunology, F-76000 Rouen, France

## **Corresponding author:**

Alexandre Lemieux

Department of Medicine, Service of Dermatology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

1000 rue Saint-Denis, Montréal, Québec, Canada

H2X 3J4

Phone number: +1-514-890-8000

E-mail: alexandre.lemieux.2@umontreal.ca

Word count: 1441 words

## KEY POINTS

**Question:** What is the clinical relevance of anti-rituximab antibodies (ARA) in pemphigus patients treated with rituximab (RTX)?

**Findings:** ARA were detected in 13/42 patients (31%) during the year following the initial cycle of RTX. The proportion of patients who achieved complete remission or relapsed was not different whether patients had ARA or not. However, the two long-term relapses observed after RTX occurred in patients with ARA who had incomplete blood B-cell depletion, low serum RTX concentration and persistent anti-desmoglein 3 auto-antibodies.

**Meaning:** ARA are frequently detected in pemphigus patients treated with RTX but generally do not compromise patients' outcome.



## ABSTRACT

**Importance:** The clinical relevance of anti-rituximab antibodies (ARA) in pemphigus patients treated with rituximab is currently unknown.

**Objective:** To determine the prevalence of ARA in pemphigus patients treated with rituximab and their effect on complete remission and relapse.

**Design:** A post hoc analysis of the Ritux3 trial conducted from January 2010 to December 2015. The proportions of patients who achieved complete remission or relapsed after an initial cycle of rituximab were compared depending on whether patients had ARA or not.

**Setting:** Twenty-five dermatology departments in France.

**Participants:** Forty-two patients with moderate-to-severe pemphigus from the rituximab arm were included. Five additional patients treated with the same regimen were recruited for an ancillary study.

**Exposure:** 1000mg of rituximab on Day 1 and 15 and two maintenance infusions of 500mg at Month 12 and 18.

**Main Outcome(s) and Measure(s):** Rates of complete remission at Month 36 and relapse during this period. ARA, anti-desmoglein1/3 and RTX serum concentrations, and peripheral blood CD19<sup>+</sup> B-cell frequency were measured.

**Results:** ARA were detected in 13/42 patients' sera (31%) during the first year. The immunological parameters of 9 patients who relapsed early could not be further analyzed, since they were re-treated with rituximab after they relapsed. Among the 33 patients remaining, the rate of complete remission at Month 36 was not different whether patients had ARA (12/13

[92%]) or not (20/20 [100%])(P=0.39). A CD19<sup>+</sup> B-cell frequency >0.5% six months after the last infusion of rituximab was observed in 5/20 patients (25%) without ARA, and 6/13 (46%) with ARA (P=0.21). The concentration of rituximab in these latter 6 patients was lower than in patients with ARA who had complete B-cell depletion (1.6±2.7µg/ml vs 16.6±4.0µg/ml; P=0.0002), or patients without ARA (13.5±6.2µg/ml; P=0.0006). Persistent anti-desmoglein3 antibodies was also noted in 3/6 (50%) of these patients, compared to 1/7 (14%; P=0.16) in patients with ARA and complete B-cell depletion and 0/20 (P=0.0008) in patients without ARA. In total, 2 patients relapsed and both had ARA with undetectable rituximab level, incomplete B-cell depletion and persistent anti-desmoglein3 antibodies.

**Conclusions and Relevance:** ARA are frequently detected in pemphigus patients, and generally do not affect patients' outcome, except in a few patients with incomplete B-cell depletion, lower rituximab concentration, and persistent serum anti-desmoglein3 antibodies.

**Trial Registration:** NCT00784589

## Introduction

Rituximab (RTX), a chimeric monoclonal antibody (Ab) anti-CD20, is approved as a first-line treatment for moderate-to-severe pemphigus. Its superiority over a conventional regimen of corticosteroids and mycophenolate mofetil has been demonstrated<sup>1,2</sup>. Relapses after RTX are dependent upon whether or not maintenance infusions are performed, and increase overtime after stopping RTX infusions<sup>1-4</sup>.

Main predictors for not achieving complete remission (CR) or relapsing after RTX are severe pemphigus at baseline, high body mass index, the autoimmune regimen of RTX (versus the lymphoma regimen adapted to patients' weight), and the persistence of anti-desmoglein (DSG) Abs three months after the initial cycle<sup>4,5</sup>.

Anti-RTX Abs (ARA) have rarely been studied in pemphigus patients and occasionally described in patients who did not achieve CR after RTX<sup>6,7</sup>, as in other auto-immune diseases<sup>8-10</sup>.

The objectives of this study were to evaluate the prevalence of ARA in patients with pemphigus treated with RTX, and their effect on achievement of CR and occurrence of relapses.

## Methods

Forty-two out of 46 patients assigned to the RTX arm of the Ritux3 trial (NCT00784589) were included in this study. Four patients were excluded because their sera were not available. Patients were treated with 1000mg of intravenous RTX on Day 1 and 15, and two maintenance infusions of 500mg at Month 12 and 18, combined with a short course of prednisone tapered over 3 to 6 months. Patients were followed until Month 36, and their clinical status at Month 36 (CR and relapse) was defined according to the consensus statement definition for pemphigus endpoints<sup>11</sup>. Five additional patients who were treated with the same regimen of RTX and relapsed were recruited as part of an ancillary study to validate our findings.

Serum ARA and RTX concentrations were measured using a commercially available RTX enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (LISA-TRACKER Duo Rituximab, Theradiag). Anti-DSG1 and anti-DSG3 Abs were measured using the EUROIMMUN Desmoglein test, (Medizinische Labordiagnostika). Peripheral blood CD19<sup>+</sup> B-cell frequency was evaluated by flow cytometry with a BD LSRFortessa™ cell analyzer.

B-cell count was performed just before the maintenance infusion of RTX at Month 12 and Month 18. The concentration of RTX was measured two months after these two maintenance infusions, at Month 14 and 20. A first detection of ARA was performed just before the first maintenance infusion of RTX at Month 12, and then at Month 36, corresponding to a time point far from the last infusion of RTX. In addition, ARA were measured before Month 12 at the time of relapse in nine patients who relapsed early during the first year after the initial cycle of RTX.

Statistical analyses were performed with GraphPadPrismV8 (GraphPad Software, CA, USA). The proportion of CR and relapses in patients with or without ARA was compared using Fisher's exact test. ARA serum levels and CD19<sup>+</sup> B-cell frequencies were compared using paired t-test. One-way ANOVA was used for RTX and anti-DSG3 serum level comparisons. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **Results**

### ***Prevalence of ARA and clinical endpoints (CR and relapse)***

Among the 42 patients included from the RTX arm in the Ritux3 trial, ARA were detected in 13 patients (31%). Nine patients relapsed during the first year after the initial cycle of RTX and could not be further analyzed since these patients received additional RTX infusions that prevented the detection of ARA at Month 12 and other dosages scheduled in the protocol. However, none of these nine patients had ARA at the time they relapsed.

Among the 33 remaining patients, ARA were detected at Month 12 in 13 patients (39%) (Table 1). The mean serum concentration of ARA decreased from  $90\pm 54$ ng/ml at Month 12 to  $41\pm 24$ ng/ml at Month 36 ( $P=0.02$ ) (Figure 1).

The proportion of patients who achieved CR at the Month 36 evaluation was not different whether patients had ARA or not [ARA<sup>+</sup>: 12/13 (92%) vs ARA<sup>-</sup>: 20/20 (100%);  $P=0.39$ ] (Table 1). Two of the 13 patients with ARA (15%) relapsed between Month 12 and 36 (including one patient who achieved CR at Month 36 after he relapsed), compared with 0 of 20 patients without ARA ( $P=0.07$ ) (Table 1).

### ***Other serological and immunological findings***

CD19<sup>+</sup> B-cell frequency decreased from  $8.6\pm 7.3\%$  at Month 12 (after the initial cycle of RTX) to  $1.8\pm 4.1\%$  at Month 18 (six months after the first maintenance infusion of RTX at Month 12) ( $P=0.0009$ ) in patients without ARA, and from  $9.6\pm 7.6\%$  to  $3.5\pm 4.7\%$  ( $P=0.04$ ) in patients with ARA (Figure 2A).

An incomplete CD19<sup>+</sup> B-cell depletion at Month 18 (defined as CD19<sup>+</sup> B-cells  $>0.5\%$ ) was observed in 6 of 13 patients with ARA (46%), compared with 5 of the 20 patients without ARA (25%) ( $P=0.21$ ) (Table 1).

We then assessed the proportion of relapses: i) in patients with ARA depending on whether they had incomplete or complete B-cell depletion, and ii) in patients without ARA. Relapse rates in these 3 groups were 2/6 (33%), 0/7, and 0/20, respectively.

Interestingly, the concentration of RTX at Month 14 was much lower in patients with ARA and incomplete B-cell depletion than in patients with ARA and complete B cell depletion, or without ARA:  $1.6\pm 2.7\mu\text{g/ml}$ , versus  $16.6\pm 4.0\mu\text{g/ml}$  ( $P=0.0002$ ) versus  $13.5\pm 6.2\mu\text{g/ml}$  ( $P=0.0006$ ), respectively (Figure 2B). These differences were slightly lower when RTX dosage was performed at Month 20:  $4.5\pm 9.4\mu\text{g/ml}$  versus  $11.9\pm 5.4\mu\text{g/ml}$  ( $P=0.31$ ) versus  $12.7\pm 10.0\mu\text{g/ml}$  ( $P=0.17$ ).

Accordingly, mean serum anti-DSG3 ELISA values at Month 18 were higher in patients with ARA and incomplete B-cell depletion relative to the 2 other groups:  $56.0 \pm 68.6$  AU/ml, versus  $12.1 \pm 22.2$  AU/ml ( $P=0.03$ ) versus  $4.0 \pm 4.3$  AU/ml ( $P=0.002$ ) (Figure 2C).

### ***Ancillary study***

Since the two patients who relapsed had ARA with incomplete B-cell depletion, undetectable RTX concentration ( $0.0 \mu\text{g/ml}$ ) and persistence of high levels of anti-DSG3 Abs ( $342$  AU/ml) suggesting the involvement of ARA in the occurrence of relapses, we performed a dosage of ARA in five additional patients who were not included in the Ritux3 trial, but were treated with the same regimen of RTX. They were selected among a cohort of 46 patients followed in our center because they relapsed once or more following RTX treatment. ARA were not detected in any of these five patients at the time of their relapse (eTable 1 in the Supplement). Mean CD19<sup>+</sup> B-cell frequency measured at the time of relapse was of 0% in the 3 patients who relapsed within 9 months after the last infusion of RTX, and of  $6.6 \pm 4.8\%$  in the two other patients who relapsed from 12 to 18 months after RTX infusion. Mean anti-DSG1 and anti-DSG3 ELISA values measured at the time of relapse in these five patients were of  $70.8 \pm 83.5$  AU/ml and  $160.4 \pm 294.9$  AU/ml, respectively.

### **Discussion**

The main finding of this study is that ARA are frequently detected in pemphigus patients treated with RTX since they were found in 31% of patients, which is in accordance with the 32% rate recently reported in the PEMPHIX clinical trial <sup>2</sup>.

Importantly, the presence of ARA did not influence the rate of CR, which was achieved in 92% and 100% of patients with or without ARA, respectively. Therefore, the development of ARA does not seem to be a contraindication to further infusions of RTX, especially as their mean level decreased overtime with additional maintenance infusions of RTX, as previously observed in patients with optic neuromyelitis <sup>12</sup>.

Indeed, most patients in the present study had a complete depletion of CD19<sup>+</sup> B-cells after RTX, whether or not they developed ARA, with however a slightly lower proportion among patients with ARA (53.8%) than in patients without ARA (75%). Accordingly, patients with ARA who had complete B-cell depletion had similar concentrations of RTX and anti-DSG3 ELISA values as patients without ARA, suggesting that ARA are generally not clinically relevant.

However, our findings suggest that ARA might be associated with the occurrence of late relapses (after 12 months) despite maintenance RTX infusions in a very few patients, in particular those with a combination of incomplete B-cell depletion, low concentration of RTX and persistence of anti-DSG3 Abs, since two of the three patients with these characteristics experienced a relapse. Incomplete B-cell depletion after RTX and low RTX concentration have also recently been identified as predictors of relapse in patients with membranous nephropathy<sup>13</sup>. However, our ancillary study suggests that this situation is infrequent in pemphigus, since we did not detect ARA in the five additional patients who relapsed after having been treated with same RTX regimen as in the Ritux3 trial.

## **Conclusion**

Overall, this study has shown that even though ARA are quite frequently detected in pemphigus patients treated with RTX and might be clinically relevant in a few patients with both an incomplete B-cell depletion and low RTX concentration, they generally do not affect the course of pemphigus patients, nor contraindicate the use of further maintenance infusions of RTX.

## References

1. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, et al; French study group on autoimmune bullous skin diseases. First-Line Rituximab Combined with Short-Term Prednisone versus Prednisone Alone for the Treatment of Pemphigus (Ritux 3): A Prospective, Multicentre, Parallel-Group, Open-Label Randomised Trial. *Lancet*. 2017;389(10083):2031–2040. doi:10.1016/S0140-6736(17)30070-3
2. Werth VP, Joly P, Mimouni D, et al; PEMPHIX Study Group. Rituximab versus Mycophenolate Mofetil in Patients with Pemphigus Vulgaris. *N. Engl. J. Med*. 2021;384(24):2295–2305. doi:10.1056/NEJMoa2028564.
3. 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(175). doi:10.1126/scitranslmed.3005166.
4. Mignard C, Maho-Vaillant M, Golinski ML, et al; French Study Group on Autoimmune Bullous Skin Diseases. Factors Associated With Short-Term Relapse in Patients With Pemphigus Who Receive Rituximab as First-Line Therapy: A Post Hoc Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 2020;156(5):545–552. doi:10.1001/jamadermatol.2020.0290.
5. 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(12):1404–1409. doi:10.1001/jamadermatol.2019.3236.
6. Schmidt E, Hennig K, Mengede C, Zillikens D, Kromminga A. Immunogenicity of Rituximab in Patients with Severe Pemphigus. *Clin. Immunol*. 2009;132(3):334–341. doi:10.1016/j.clim.2009.05.007.



7. Lunardon L, Payne AS. Inhibitory Human Antichimeric Antibodies to Rituximab in a Patient with Pemphigus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;130(3):800–803. doi:10.1016/j.jaci.2012.03.022.
8. Bertrand Q, Mignot S, Kwon T, et al. Anti-Rituximab Antibodies in Pediatric Steroid-Dependent Nephrotic Syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 2021. doi:10.1007/s00467-021-05069-w.
9. Albert D, Dunham J, Khan S, et al. Variability in the Biological Response to Anti-CD20 B Cell Depletion in Systemic Lupus Erythaematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67(12):1724–1731. doi:10.1136/ard.2007.083162.
10. Thurlings RM, Teng O, Vos K, et al. Clinical Response, Pharmacokinetics, Development of Human Anti-Chimaeric Antibodies, and Synovial Tissue Response to Rituximab Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69(2):409–412. doi:10.1136/ard.2009.109041.
11. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, et al. Consensus Statement on Definitions of Disease, End Points, and Therapeutic Response for Pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008;58(6):1043–1046. doi:10.1016/j.jaad.2008.01.012.
12. Lebrun C, Cohen M, Rosenthal-Allieri MA, et al. Only Follow-Up of Memory B Cells Helps Monitor Rituximab Administration to Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Neurol. Ther.* 2018;7(2):373–383. doi:10.1007/s40120-018-0101-4.
13. Boyer-Suavet S, Andreani M, Lateb M, et al. Neutralizing Anti-Rituximab Antibodies and Relapse in Membranous Nephropathy Treated With Rituximab. *Front. Immunol.* 2020;10(3069). doi:10.3389/fimmu.2019.03069

## Table

**Table 1.** Baseline characteristics and clinical evolution of patients with and without anti-rituximab antibodies (ARA) at Month 12

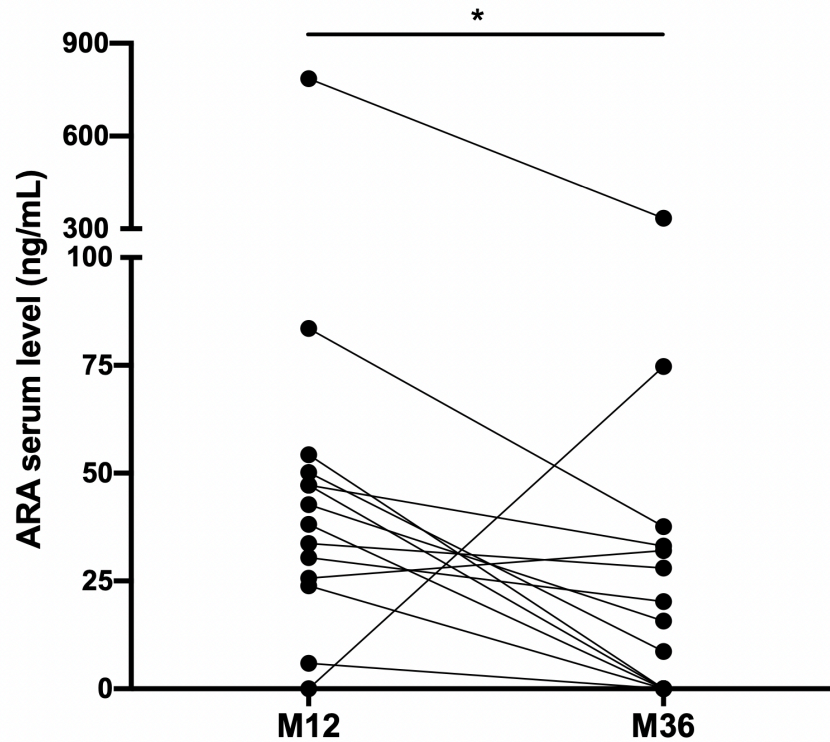
Characteristics	With ARA (n = 13)	Without ARA (n = 20)	P value
Age, y, mean ± SD	55 ± 17	56 ± 17	0.99
Male/Female, n	2/11	11/9	0.03
PDAI score, mean ± SD	30 ± 26	28 ± 25	0.80
Type of pemphigus			
Foliaceous, n (%)	1 (8)	4 (20)	0.33
Vulgaris, n (%)	12 (92)	16 (80)	0.33
Mucosal, n (%)	4 (33)	4 (25)	
Muco-cutaneous, n (%)	7 (58)	11 (69)	
Cutaneous, n (%)	1 (8)	1 (6)	
Anti-DSG1, AU/ml, mean ± SD*	121 ± 138	253 ± 328	0.18
Anti-DSG3, AU/ml, mean ± SD*	1093 ± 1350)	465 ± 517	0.11
Incomplete B-cell depletion**			
(CD19 <sup>+</sup> B-cells >0.5%), n (%)	6 (46)	5 (25)	0.21
Clinical evolution			
CR at Month 36, n (%)	12 (92)	20 (100)	0.39
Relapse, n (%)	2 (15)	0 (0)	0.07

\* Measured at baseline using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

\*\* Measured at Month 18 (6 months after the Month 12 infusion of RTX)

Abbreviations: ARA, anti-rituximab antibody; AU, arbitrary unit; DSG, desmoglein; PDAI, pemphigus disease area index; SD, standard deviation; y, year.

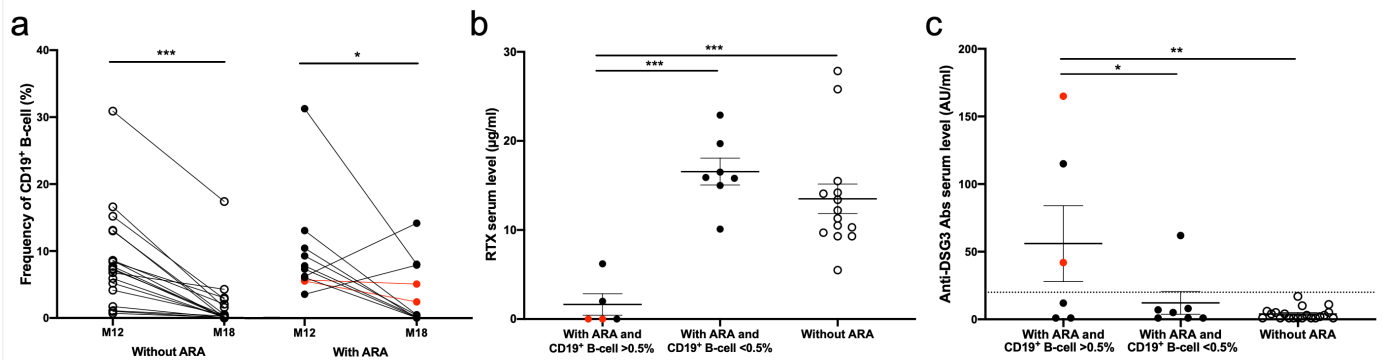
## Figures



**Figure 1. Evolution of ARA serum levels from Month 12 to Month 36 in the 13 patients with ARA**

ARA serum levels were measured by ELISA at Month 12 following the initial RTX infusion performed at baseline, and at Month 36 after the two maintenance infusions of RTX at Months 12 and 18. (\* P<0.05)

ARA, anti-rituximab antibodies; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; RTX, rituximab.



**Figure 2. Frequency of CD19<sup>+</sup> B-cells in patients with and without ARA, and concentration of RTX and anti-DSG3 antibody serum levels in the 33 patients analyzed**

Panel A: CD19<sup>+</sup> B-cells in the peripheral blood of patients with or without ARA from Month 12 (time of B-cell reconstitution) to Month 18 (6 months after the first maintenance infusion of RTX at Month 12).

Panel B: Serum concentration of RTX at Month 14 (2 months after the first maintenance infusion of RTX at Month 12) in patients with: (left column) ARA and incomplete B-cell depletion (B-cell >0.5%), (middle column) patients with ARA and complete B-cell depletion (B-cell <0.5%), and (right column) patients without ARA.

Panel C: Anti-DSG3 Abs serum level at Month 18 in patients with: (left column) ARA and incomplete B-cell depletion (B-cell >0.5%), (middle column) patients with ARA and complete B-cell depletion (B-cell <0.5%), and (right column) patients without ARA. The positivity threshold for anti-DSG3 Abs is represented by the dotted line.

Relapsing patients are identified in red. (\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001)

Abs, antibodies; ARA, anti-rituximab antibodies; DSG, desmoglein; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; RTX, rituximab.

## Supplemental material

**eTable 1.** Clinical and serological characteristics of the 5 patients with relapse from the ancillary study.

Characteristics	Relapse (n = 5)
Age, y, mean $\pm$ SD	45.6 $\pm$ 25.3
Male/Female, n	3/2
PDAI score, mean $\pm$ SD	7.8 $\pm$ 11.7
Type of pemphigus	
Foliaceus, n (%)	2 (40)
Vulgaris, n (%)	3 (60)
Time between RTX and relapse, Months $\pm$ SD	9.9 $\pm$ 6.0
RTX dose, g $\pm$ SD	1.1 $\pm$ 0.6
RTX serum level ( $\mu$ g/ml)	undetectable
ARA serum level (ng/ml)	undetectable
Anti-DSG1, AU/ml, mean $\pm$ SD*	70.8 $\pm$ 83.5
Anti-DSG3, AU/ml, mean $\pm$ SD*	160.4 $\pm$ 294.9
Incomplete B-cell depletion**	
CD19 <sup>+</sup> B-cells >0.5%, n (%)	2 (40)
B-cell frequency % $\pm$ SD	2.6 $\pm$ 4.3

\* Measured at baseline using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

\*\* Measured at Month 18 (6 months after the Month 12 infusion of RTX)

Abbreviations: ARA, anti-rituximab antibody; AU, arbitrary unit; DSG, desmoglein; PDAI, pemphigus disease area index; RTX, rituximab; SD, standard deviation; y, year.

## CHAPITRE 6 – DISCUSSION GÉNÉRALE

Les 3 articles présentés s'inscrivent dans un grand projet de suivi immunologique des patients atteints de pemphigus inclus dans l'étude RITUX3, afin de mieux comprendre la pathogénèse, l'évolution clinique, identifier des biomarqueurs pouvant servir au suivi clinique des patients et améliorer la prise en charge thérapeutique. La discussion générale sera séparée par articles, avec une emphase sur les articles 2 et 3, comme il s'agit d'articles courts pour lesquels une discussion n'a pas déjà été présentée plus longuement dans l'article.

### **Article 1 : Diversité des sous-classes d'IgG anti-Dsg3 et l'impact sur l'activité de la maladie et la survenue de rechute**

Cette étude nous a permis de décrire la diversification des sous-classes d'IgG anti-Dsg3 chez les patients atteints de PV, en plus d'étudier leur pathogénicité *in vitro*. Nous avons établi le lien entre cette diversité et l'activité de la maladie, et potentiellement expliqué la persistance des Ac anti-Dsg3 circulants chez des patients en rémission clinique. En effet, jusqu'à maintenant, la pathogénicité des Ac anti-Dsg3 en maladie active était principalement associée à la sous-classe IgG4. Peu d'informations sont disponibles quant à la réelle diversité isotypique des Ac anti-Dsg3 et surtout de son impact potentiel dans la maladie. De plus, on arrive encore peu à expliquer la persistance des Ac anti-Dsg3 chez des patients en RC, outre le fait que certains articles ont rapporté un passage des IgG4 vers les IgG1 anti-Dsg3.

Comme attendu, la sous-classe d'IgG anti-Dsg3 la plus fréquemment détectée était les IgG4 chez 90% des patients, et celle-ci persistait chez tous les patients, sauf un, en rémission clinique lorsqu'ils avaient des Ac circulants détectables. Il était toutefois intéressant de noter que 61% des patients au diagnostic et 75% des patients au temps rechute présentaient au moins 2 sous-classes d'IgG, comparativement à 64% des patients en RC qui présentait une seule

sous-classe, principalement l'IgG4. Ceci porte à croire qu'une plus grande diversité d'IgG anti-Dsg3 est associée à une activité de la maladie chez la majorité des patients.

De plus, nous avons remarqué que la majorité des patients en RC qui présentaient des Ac anti-Dsg3 était principalement de la sous-classe IgG4, alors qu'il avait précédemment été rapporté que l'absence de pathogénicité des Ac anti-Dsg3 chez les patients en RC était associée à une commutation des IgG4 vers les IgG1 [65, 68]. Dans notre cohorte, cette absence de pathogénicité dépendait plutôt du titre d'Ac circulants, et nous avons justement observé une corrélation entre l'état clinique et le taux d'IgG4 anti-Dsg3. En test de pathogénicité *in vitro*, l'activité pathogène des IgG4 anti-Dsg3 dépendait fortement du taux d'Ac; en ajustant les titres d'Ac chez les patients en RC avec IgG4 anti-Dsg3 au même taux présent lors du diagnostic initial, la pathogénicité de ces Ac était restaurée. Ceci pourrait expliquer une portion des persistances d'Ac anti-Dsg3 chez des patients en RC et, du même coup, expliquer la faible spécificité des titres d'Ac anti-Dsg3 pour suivre l'évolution de la maladie comparativement aux Ac anti-Dsg1 [30, 72].

Or, il est probable que la pathogénicité des Ac anti-Dsg3 soit aussi associée à une plus grande diversité de sous-classes d'IgG anti-Dsg3, qui était fréquemment détectée lors du diagnostic. Nous avons d'ailleurs démontré l'exemple d'un patient avec des IgG3 et IgG4 anti-Dsg3 qui démontrait une pathogénicité *in vitro*, alors que le même sérum prélevé lors de sa RC et qui ne contenait que des IgG4 n'était plus pathogène, malgré que le taux sérique était similaire à celui initialement mesuré. Évidemment, un élément important à considérer, et que nous n'avons pas encore vérifié, est l'épitope ciblé par les Ac non-pathogènes, en l'occurrence les domaines EC1/EC2 versus les domaines EC3/EC4/EC5. Il est possible qu'un IgG4 anti-Dsg3 qui ne soit pas pathogène ait procédé à une propagation d'épitope et qu'il cible désormais des régions non pathogènes de la protéine lorsqu'un patient est en RC. Ceci reste toutefois à confirmer par de plus amples expérimentations.

Nous avons aussi remarqué qu'initialement au jour 0, les sérums des patients ayant rechuté en cours d'évolution contenaient un nombre moyen de sous-classes d'IgG plus élevé comparativement aux patients en RC ( $2,6 \pm 0,8$  versus  $1,5 \pm 0,9$  ;  $p=0,01$ ). Ceci porte à croire qu'une plus grande diversité de sous-classes pourrait prédire la survenue d'une rechute clinique. La présence d'au moins 3 sous-classes d'IgG anti-Dsg3 correspondait en fait à une valeur prédictive positive de 62,5% et une valeur prédictive négative de 92%. Les rechutes étaient aussi significativement plus fréquentes chez les patients qui présentaient initialement des IgG3 anti-Dsg3, étant détectés chez 71,4% des rechuteurs, comparativement à 11,5% des patients en RC. Il est possible que des différentes sous-classes d'anti-Dsg3 ciblent des épitopes distincts sur la Dsg3 et puissent expliquer cette différence importante au niveau clinique. Actuellement, un des défis qui persiste dans le traitement et le suivi des patients atteints de pemphigus est de savoir comment bien prédire et prévenir une rechute qui nécessiterait des perfusions supplémentaires de RTX. Ces données pourraient potentiellement être importantes et fournir des biomarqueurs aux cliniciens pour traiter en amont les patients à risque de rechute et éviter la détérioration clinique.

Pour appuyer l'importance des IgG3 anti-Dsg3, nous avons étudié leur pathogénicité *in vitro* par test de dissociation à la dispase et par immunofluorescence. Nous sommes parvenu à démontrer que l'adsorption spécifique des IgG3 anti-Dsg3 abolissait l'acantholyse induite par un sérum qui contenait alors qu'un faible niveau d'IgG4 anti-Dsg3 non pathogène. Il s'agit de la première démonstration *in vitro* de la pathogénicité des IgG3 anti-Dsg3, et ça souligne le fait que la maladie peut être induite par d'autres sous-classes que l'IgG4.

La principale limitation de l'étude, comme mentionné, est le fait que nous n'avons pas étudié les épitopes précisément ciblés par chacune des sous-classes, ce qui pourrait aider à comprendre davantage la pathogénicité observée avec chacune des sous-classes d'IgG anti-Dsg3, comme observé par Cho *et al.* [210]. Il s'agit d'ailleurs d'une étape en cours au laboratoire



et qui permettra éventuellement de mieux comprendre cette diversification isotypique en maladie active et en rémission clinique.

Ces résultats fournissent un potentiel outil supplémentaire aux cliniciens qui pourraient éventuellement prendre en considération la diversité des sous-classes d'IgG anti-Dsg3 pour caractériser le risque de rechute et l'évolution des patients. Certains patients pourraient bénéficier d'une thérapie individualisée selon leurs facteurs de risques biologiques de rechute et recevoir des perfusions supplémentaires de RTX pour prévenir la récurrence de la maladie en cours de traitement.

## **Article 2 : Prévalence et pathogénicité des Ac anti-Dsc3 intracellulaires**

Cette étude nous a permis de déterminer la prévalence d'Ac dirigés contre la portion intracellulaire de la Dsc3 dans une cohorte de patients atteints de pemphigus, à l'aide d'une méthode de détection spécifique mise au point au laboratoire et basée sur la technique de l'ALBIA. La pathogénicité *in vitro* de ces Ac a également été évaluée.

La réelle prévalence et pertinence des Ac anti-Dsc3 reste encore peu comprise, particulièrement ceux ciblant des épitopes intracellulaires. Jusqu'à maintenant, les études se sont concentrées sur les Ac ciblant les régions extracellulaires de la Dsc3, mais les résultats sont contradictoires, avec des prévalences allant de 0% à 40% selon la méthode de détection utilisées. Les plus récentes études ont utilisé l'ELISA ou l'immunoblot, notamment un récent article de Metlzanidou *et al.* qui ont mis en évidence que les IgG anti-Dsc3 révélés par immunoblot n'avaient été détectés chez aucun des 45 patients de leur cohorte [154]. La méthode utilisée pour la détection des Ac anti-Dsc3 est importante et semble dépendante du maintien de la conformation des épitopes, puisque Hisamatsu *et al.* avaient justement démontré parmi leurs 8 patients, que seulement 1/8 était positif en anti-Dsc3 par méthode ELISA, mais 7/8 l'étaient lorsqu'une méthode par cellules COS-7 transfectées étaient utilisées

[156]. Une méthode de détection sensible et spécifique devait donc être développée, et nous avons choisis l'ALBIA qui est connue pour être plus sensible que l'ELISA et permet de conserver la conformation tridimensionnelle de l'antigène que nous avons d'ailleurs fait produire en cellules d'insectes. De plus, suite à l'étude de Chernyavsky *et al.* en 2019 qui a démontré le potentiel pathogène d'une cible intracellulaire de la Dsc3, nous avons décidé d'étudier davantage ce nouvel Ac jusqu'à ce jour non caractérisé dans une cohorte de patients avec pemphigus.

Nous avons démontré que la présence d'Ac ciblant la portion intracellulaire de la Dsc3 n'était pas un phénomène rare chez les patients atteints de pemphigus, puisqu'ils étaient détectés chez 21% des patients, principalement de type IgA (16%), et moins fréquemment d'IgG (7%). La majorité des articles jusqu'à maintenant regardaient exclusivement la présence d'IgG anti-Dsc3, ce qui peut possiblement expliquer cette faible prévalence occasionnellement décrite si les IgA anti-Dsc3 prédominent. De plus, le taux sérique d'IgG anti-Dsc3 diminuait rapidement sous le seuil de positivité 90 jours suivant l'introduction d'un traitement chez les patients en RC, alors que les patients en maladie active conservaient des taux plus élevés d'IgG anti-Dsc3. Ceci était similaire à ce qui peut être observé avec les Ac anti-Dsg1 dont le niveau sérique corrèle bien avec l'activité de la maladie [27]. Les IgA anti-Dsc3 avaient quant à eux tous diminué sous le seuil de positivité, et ce, peu importe le statut clinique du patient. Il est possible que ces deux classes d'Ig aient un rôle différent dans le maintien et l'induction de la maladie, respectivement, pouvant ainsi expliquer cette divergence, mais ceci reste à confirmer.

L'ALBIA est une technique connue comme étant nettement plus sensible que l'ELISA, ce qui augmente inévitablement le risque de faux positifs. D'ailleurs, 5% des donneurs sains présentaient des dosages positifs en IgG (2%) et en IgA (3%) anti-Dsc3. Par contre, nous avons démontré que ceux-ci représentaient bel et bien des faux positifs en test de pathogénicité *in vitro*, puisque les Ig purifiés des donneurs sains n'induisaient pas d'acantholyse, comme c'était le cas pour les patients. Nous avons fait le choix d'utiliser une méthode plus sensible dans un

contexte de dépistage initial pour obtenir une meilleure idée de la réelle prévalence de ces Ac dans le pemphigus. Nous avons également démontré la spécificité des Ac anti-Dsc3 aux patients atteints de pemphigus, puisqu'ils n'étaient pas été détectés chez les patients atteints d'autres maladies auto-immunes, telles que la pemphigoïde bulleuse (PB), la pemphigoïde des membranes muqueuses (PMM) ou le LED. Cette spécificité au pemphigus peut supporter une potentielle contribution dans la pathogénèse de la maladie, puisque ça ne semble pas être un Ac couramment détecté de façon non spécifique. Finalement, compte tenu de la sensibilité élevée, l'hypothèse de réaction croisée avec la portion extracellulaire de la Dsc3 pourrait être évoquée, mais nous savons qu'il existe une très faible similitude entre l'épitope de la portion N-terminale EC1 de la Dsc3 et la portion intracellulaire (AA 712-896) utilisée dans le cadre de ce projet, soit <30%. Le risque de réaction croisée est donc faible et nous avons considéré que la prévalence obtenue est bien représentative des Ac dirigés contre la portion intracellulaire. Il y a aussi une très faible similitude entre cette portion et la séquence extracellulaire de la Dsg3.

Jusqu'à maintenant, et tel que décrit dans l'introduction, des Ac ciblant la portion extracellulaire des cadhérines desmosomales étaient principalement décrits, et leur mécanisme d'action est facilement expliqué par l'encombrement stérique. En effet, en se fixant sur la portion N-terminale extracellulaire, ils nuisent à la fonction d'adhésion et induisent une acantholyse. Toutefois, ce mécanisme ne peut pas s'appliquer aux Ac qui ciblent la portion intracellulaire. Une des hypothèses du mécanisme d'action des Ac ciblant la portion intracellulaire de la Dsc3 vient du transporteur Fc néonatal (FcRn). En effet, ce transporteur membranaire, encodé par le gène *FCGRT*, participe activement au recyclage des Ig en s'y fixant et prévient leur dégradation lysosomale. Il a été récemment démontré que certains Ac ciblant des antigènes intracellulaires chez les patients atteints de pemphigus dépendaient du FcRn [211]. En effet, ces anticorps dirigés contre la SPCA1 parvenaient à traverser la membrane plasmique et se fixaient sur leur cible localisée dans la paroi de l'appareil de Golgi des KC. La pré-incubation avec un inhibiteur du FcRn empêchait cette fixation et abolissait la pathogénicité des Ac *in vitro*. Il est donc possible que les Ac anti-Dsc3 dirigés contre la portion intracellulaire puissent pénétrer dans le KC via le FcRn afin d'atteindre leur cible intracytoplasmique. Cette

explication permet de fournir un rationnel supplémentaire à l'utilisation potentielle de l'efgartigimod, un Ac de type IgG1 anti-FcRn, actuellement utilisé dans certaines études cliniques chez les patients atteints de pemphigus. L'extension de cette étude au laboratoire a entre autres pour but de vérifier l'effet du blocage du FcRn sur la pathogénicité des Ac anti-Dsc3 dirigés contre la portion intracellulaire, et ceci permettrait de mieux définir leur mécanisme d'action. La cascade d'évènements suivant leur fixation intracellulaire reste aussi à déterminer, mais il est possible qu'ils agissent via l'activation de voies de signalisation intracellulaire, comme la P38-MAPK ou la Rho-GTPase, décrite avec les Ac anti-Dsg, et fragilisent ainsi l'intégrité des KC. Cette fragilité peut engendrer la déstabilisation des liaisons dans la desmogleine et exposer les épitopes des fragments EC1 et EC2 des Dsg et Dsc et déclencher la réponse auto-immune contre ces cibles extracellulaires. Justement, il a été récemment démontré que des IgG anti-Dsc3 ciblant la portion extracellulaire parvenaient à activer la signalisation intracellulaire de la P38-MAPK et de l'EGFR [212]. D'ailleurs, il est bien connu que d'autres dermatoses bulleuses auto-immunes sont causées par des Ac ciblant des épitopes intracellulaires, comme la PB avec les Ac anti-BP230 et le PPN avec les Ac anti-envoplakine et anti-périplakine. La pathogénicité de ces cibles intracellulaires a d'ailleurs déjà été démontrée *in vitro* et *in vivo* [213].

Nous sommes parvenus à bien démontrer la pathogénicité de ces Ac anti-Dsc3 dirigés contre la portion intracellulaire. En effet, les 5 patients présentés dans la Figure 1 de l'article 2 démontraient tous une acantholyse *in vitro* et l'adsorption spécifique de leur Ac anti-Dsc3 abolissait la pathogénicité de leur Ig. Il s'agit de la première démonstration de la pathogénicité *in vitro* d'IgA anti-Dsc3. Ces patients représentaient d'ailleurs tous des cas de discordance avec la TCD. En effet, il s'agissait d'un patient avec un PV muqueux sans anti-Dsg1/3 (patient A), de deux patients avec un PV cutané-muqueux avec seulement des anti-Dsg3 (patient D et E) et finalement, de deux patients avec un PV cutané ayant exclusivement des anti-Dsg1 (patient F et G). Ces patients présentaient aussi tous un clivage supra-basal en histologie. Considérant la distribution supra-basale de la Dsc3, similaire à la Dsg3, la présence de ces Ac permettait de bien expliquer ces phénotypes histologiques discordant avec la TCD. Il est particulièrement intéressant de souligner les deux cas de PV cutané ayant une combinaison d'Ac anti-Dsc3 et

anti-Dsg1; cette entité est très peu expliquée dans la littérature actuellement, et ni même mentionnée dans la TCD, alors que jusqu'à 5-10% des cas de PV sont exclusivement cutanés [109]. La présence d'Ac non spécifiques à la Dsg pourrait donc potentiellement expliquer ce phénotype clinique, en combinaison avec des Ac anti-Dsg1.

Dans notre cohorte, 20% (18/91) des patients pour qui les informations étaient disponibles présentaient une discordance entre leurs phénotypes cliniques et leurs profils sérologiques d'Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3. Tel que mentionné dans l'article, 44% (8/18) de ces cas étaient potentiellement expliqués par la présence d'Ac anti-Dsc3. Il y a donc vraisemblablement une plus grande diversité d'Ac qui contribuent à la pathogénèse du pemphigus, et bien que les Ac ciblant la Dsg en expliquent la majorité et semblent essentiels, ils n'agissent très probablement pas seuls. Les Ac anti-Dsc3 pourraient donc agir en synergie avec les Ac anti-Dsg1/3 pour induire les phénotypes cliniques observés.

La principale limitation de cette étude est que le rôle et l'importance des Ac anti-Dsc3 ciblant la portion intracellulaire *versus* la portion extracellulaire ne peuvent pas être établis. Pour faire suite à ces résultats, nous avons donc étudié au laboratoire la prévalence des Ac anti-Dsc3 dirigés contre la portion extracellulaire dans la même cohorte de patients. La présentation de tous les résultats dépasse ce présent mémoire et les analyses sont encore en cours, mais les résultats préliminaires démontraient que 21% (31/146) des patients présentaient des Ac dirigés contre le domaine extracellulaire de la Dsc3. Seulement 35% (11/31) des patients présentaient à la fois des Ac dirigés contre les portions extracellulaires et intracellulaires de la Dsc3, laissant donc 40 patients (27%) avec exclusivement des Ac ciblant l'une des deux portions de la Dsc3. Il est donc possible d'affirmer qu'il ne s'agit pas de réactions croisées. De plus, en combinant les 2 Ac, 72% (13/18) des cas de pemphigus qui ne respectaient pas la TCD pouvaient désormais être expliqués par la présence d'Ac dirigés contre l'une des portions de la Dsc3 (intra- ou extracellulaire). De plus, un élément important à vérifier éventuellement pour supporter la prédominance d'IgA serait de valider la présence de cette Ig en IFD ou IFI chez les patients

présentant des IgA anti-Dsc3 en ALBIA. Finalement, le test de pathogénicité avec l'adsorption spécifique des Ac anti-Dsc3 utilisant les sérums de souris a seulement pu être réalisé une fois (n=1), puisqu'un nombre significatif de souris ont été nécessaires pour obtenir la quantité désirée d'IgG pour procéder au test de dissociation à la dispase. Il s'agit donc seulement d'un résultat préliminaire mentionné dans l'article pour lequel la reproductibilité doit être validée.

### **Article 3 : Pertinence clinique et effets biologiques des ARA chez les patients traités par RTX**

Nous avons décrit la plus grande cohorte de patients atteints de pemphigus et traités par RTX pour qui la présence d'ARA et leurs effets clinico-biologiques ont été étudiés. Bien que l'impact clinico-biologique des ARA ait déjà été étudié dans plusieurs maladies auto-immunes, ils n'ont à ce jour été que très peu décrits dans le pemphigus. Toutefois, le RTX étant maintenant recommandé comme traitement de première ligne pour les PV modérés à sévères, leur compréhension chez cette population de patients est importante. Étant un Acm chimérique murin-humain, l'immunogénicité du RTX donne un risque théorique de développer des Ac neutralisants. Notre étude a été réalisée sur 42 patients issus du groupe RTX de l'étude RITUX3, incluant deux patients ayant rechuté tardivement 12 mois après le début du traitement. Le mécanisme de ces deux rechutes n'avait pas clairement été établi et nous avons émis l'hypothèse que les ARA pouvaient être en cause en ayant diminué l'efficacité des perfusions d'entretien reçues aux mois 12 et 18, et ainsi favorisé la survenue de rechute. Il est important de rappeler que neuf rechutes précoces (dans les 12 premiers mois) sont survenues dans ce groupe, mais ces patients ont été exclus des analyses immunologiques subséquentes, tel que mentionné dans l'article, car ils avaient reçu une perfusion supplémentaire de RTX lors de la rechute qui empêchait la détection d'ARA, de RTX, de LB CD19<sup>+</sup> et d'Ac anti-Dsg1/3 aux temps décrits dans notre protocole. Ces patients avaient préalablement été décrit par l'équipe dans une étude publiée en 2020; leurs rechutes étaient attribuées à un pemphigus initialement sévère (PDAI > 45) et à une persistance d'Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 à trois mois suivant le début du traitement [30].

Nous avons démontré que les ARA n'étaient pas un phénomène rare, puisqu'ils étaient détectés chez 31% des patients dans la première année suivant la première perfusion de RTX, ce qui concordait avec la récente étude PEMPHIX ayant documenté la présence d'ARA chez 32% des patients [189]. Toutefois, la majorité des Ac semblaient non fonctionnels, puisque les taux de patients en RC n'étaient pas différents, que les patients aient des ARA ou non, ce qui avait également été précédemment décrit dans d'autres maladies auto-immunes [198]. La présence d'ARA n'est donc pas une contre-indication à recevoir des perfusions subséquentes de RTX pour des traitements d'entretien. Cette donnée est importante, considérant que ces perfusions sont essentielles à la prévention des rechutes à long terme. Ceci montre aussi que le régime de RTX actuellement utilisé permet d'atteindre un haut taux de RC malgré le développement d'ARA et est tout à fait approprié. De plus, le dosage seul des ARA dans le but d'orienter la prise en charge d'un patient est peu pertinent compte tenu que la seule présence de ces Ac ne mène pas à un risque de mauvaise réponse au traitement, tel que précédemment affirmé dans une étude de 11 patients atteints de pemphigus et traités par RTX [202]. D'ailleurs, nous n'avons pas noté d'association entre les réactions d'infusion et la présence d'ARA, ce qui est aussi supporté par d'autres cohortes de patients atteints de maladies auto-immunes [214, 215]. Ces réactions avaient toutefois été décrites chez d'autres patients et suspectées d'être liées aux ARA [203, 216].

L'analyse immunologique plus approfondie des 33 patients de notre cohorte avait aussi permis de mettre en évidence que la proportion de patients qui présentait des ARA avait diminué de 39% à 12 mois, à 27% à 36 mois, avec des taux sériques moyens passant de  $90 \pm 54$  ng/ml à  $41 \pm 24$  ng/ml. Cette diminution montre que les perfusions subséquentes de RTX aux mois 12 et 18 n'ont pas favorisées le développement d'ARA au long cours, et que ces Ac proviennent possiblement de plasmocytes à courte durée de vie qui pourrait expliquer leur disparition en cours de traitement.

Toutefois, plusieurs études dans d'autres maladies auto-immunes décrivent la présence d'ARA conjointement avec un taux sérique de RTX indétectable et une déplétion incomplète des LB, ce qui laisse suspecter un caractère fonctionnel [199-201]. Justement, nous avons noté une plus grande proportion de rechutes parmi le groupe de patients avec ARA (15%) comparativement aux patients sans ARA (0%), ce qui nous laissait suspecter la contribution des ARA dans la survenue de ces rechutes tardives. Nous avons ainsi séparé les patients en trois groupes : (1) avec ARA et déplétion incomplète des LB CD19<sup>+</sup> (>0,5%), (2) avec ARA et déplétion complète des LB CD19<sup>+</sup> (<0,5%) et (3) sans ARA. Le groupe 1 était suspecté comme ayant des ARA fonctionnels qui pouvaient ainsi expliquer cette déplétion limitée des LB CD19<sup>+</sup> circulants. En comparant ces trois groupes de patients, nous avons remarqué que les patients du groupe 1 avaient des taux de RTX sérique significativement plus faibles, ainsi que des taux d'Ac anti-Dsg3 significativement plus élevés que les patients des groupes 2 et 3. De façon intéressante, seulement 3 patients avaient la combinaison de ces trois facteurs (déplétion incomplète des LB CD19<sup>+</sup>, taux de RTX indétectable et persistance des Ac anti-Dsg3). Les deux patients rechuteurs de notre étude faisaient partie de ces trois patients. Ces paramètres biologiques altérés nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les ARA pouvaient être fonctionnels dans un sous-groupe de patients spécifiques, et pourraient mener à un risque de rechute dans une faible proportion de cas. Une récente cohorte pédiatrique avec syndrome néphrotique a justement démontré la présence d'ARA qui menait à un taux sérique indétectable de RTX et une déplétion incomplète des LB circulants chez les patients rechuteurs [201], soulignant le potentiel fonctionnel des ARA.

Pour confirmer ces données dans un contexte clinique réel, nous avons ensuite spécifiquement sélectionné les sérums de 5 patients suivis dans une cohorte du groupe Bulles (groupe national français regroupant les centres experts des maladies bulleuses auto-immunes) et qui présentaient des rechutes après traitement par RTX. Cette étude ancillaire a été réalisée dans le but d'évaluer en vraie vie l'impact des ARA sur les rechutes après traitement par RTX. Les mêmes paramètres biologiques ont été analysés chez chacun de ces 5 patients. À l'inverse des résultats obtenus dans notre cohorte de 42 patients, aucun de ces 5 patients ne présentait d'ARA détectables. Néanmoins, ces 5 patients ne présentaient pas non plus les caractéristiques



biologiques mises en évidence dans notre première analyse, à savoir une déplétion incomplète des LB CD19<sup>+</sup>, un taux de RTX indétectable et/ou une persistance des Ac anti-Dsg3 après traitement. Ce second volet est bien entendu limité par le très petit effectif de patients spécifiquement sélectionnés, mais souligne le fait que les ARA ne sont pas la seule et majeure explication des rechutes à long terme sous RTX. Il y a vraisemblablement d'autres mécanismes pouvant expliquer ces récurrences ou les moins bonnes réponses au RTX. Par exemple, il a été récemment démontré que certains organes lymphoïdes tertiaires se formaient dans la peau des patients atteints de pemphigus, et ces niches de LB anti-Dsg spécifiques seraient plus difficiles à éradiquer avec le RTX qui a une pénétration tissulaire limitée aux doses utilisées et mèneraient à une production locale d'Ac anti-Dsg [181, 182]. Un polymorphisme génétique pour le FcγRIIIa pourrait aussi permettre d'expliquer certaines résistances et une action limitée du RTX, mais ceci n'a jamais été étudié chez des patients atteints de pemphigus jusqu'à maintenant.

La principale limitation de cette étude est que le mécanisme d'action potentiel des ARA qui sont jugés fonctionnels n'a pas été étudié. En effet, pour confirmer le potentiel rôle des ARA dans les rechutes tardives des deux patients documentés, il aurait été pertinent de valider la capacité de leurs ARA à inhiber la liaison du RTX au CD20 en se fixant sur le fragment Fab, ou leur capacité à empêcher l'activation de la CDC en se liant au fragment Fc. De plus, il aurait été intéressant de vérifier si la présence d'ARA pouvait conduire à un retour plus précoce des LB CD19<sup>+</sup> circulants chez les patients, ce qui a précédemment été noté dans une cohorte de patients avec néphropathie membraneuse [198], mais les échantillons de nos patients n'étaient pas disponibles à ces temps. Finalement, cette étude est aussi limitée par une petite cohorte de 33 patients, qui présentaient seulement deux rechutes tardives. Bien que ces deux patients aient présentés des ARA, il serait important de confirmer ou non la contribution de ceux-ci dans la survenue de rechute par d'autres études. Actuellement, le régime de traitement utilisé peut toutefois être considéré adéquat, puisque la très grande majorité des patients atteignaient et maintenaient une RC avec les perfusions d'entretien.

## CHAPITRE 7 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce projet a d'abord permis de démontrer qu'une plus grande diversité de sous-classes d'IgG anti-Dsg3 était associée à une maladie active et a un plus grand risque de rechute, particulièrement avec la présence d'au moins 3 sous-classes et d'IgG3 anti-Dsg3. Ceci pourrait potentiellement servir de biomarqueurs pour identifier des patients à risque de rechute et qui pourraient bénéficier de perfusions supplémentaires de RTX. De plus, nous avons fourni des éléments de réponse importants pour expliquer la persistance d'Ac anti-Dsg3 circulants chez les patients en rémission clinique. Pour faire suite à ce projet, le laboratoire étudie actuellement les différentes cibles épitopiques des Ac anti-Dsg3, soit l'EC1, EC2, EC3, EC4 et EC5, pour établir un lien entre la diversification des sous-classes d'IgG anti-Dsg3 et leurs cibles extracellulaires précises. Ceci permettra d'encore mieux expliquer l'importance d'un plus grand nombre de sous-classes et surtout de la persistance des Ac anti-Dsg3 chez certains patients en rémission clinique.

Ensuite, un ALBIA-Dsc3 a été mis au point pour déterminer la prévalence des Ac anti-Dsc3 ciblant une portion intracellulaire, et qui étaient détectés chez 21% des patients avec PV ou PF, avec une prédominance d'IgA chez 16% d'entre eux. Nous avons démontré que la présence des Ac anti-Dsc3 intracellulaire permettait d'expliquer une bonne proportion des cas de discordance entre les phénotypes cliniques, histologiques et sérologiques des patients en fonction de la TCD. Ces Ac semblaient effectivement être impliqués dans la maladie des patients, et leur capacité à induire une acantholyse *in vitro* a été démontrée à partir d'Ig de patients et de souris immunisées. Pour faire suite à cette étude, nous étudions actuellement la prévalence des Ac anti-Dsc3 ciblant la portion extracellulaire de la protéine pour évaluer la pertinence de chaque épitope, et nous développons des hybridomes et modèles *in vivo* pour mieux caractériser la pathogénicité de cette nouvelle cible intracellulaire. Avec les modèles *in vitro* et *in vivo*, nous pourrons aussi évaluer l'effet d'un inhibiteur du FcRn sur la pathogénicité pour confirmer la contribution de ce récepteur au transport intracellulaire des Ac anti-Dsc3. Ceci permet de mieux

comprendre la pathogénèse du pemphigus qui s'étend au-delà des Ac anti-Dsg1/3 actuellement décrits. Dans ce contexte, nous étudions aussi actuellement d'autres Ac non spécifiques à la Dsg, soit les Ac anti-SPCA1 et anti-CHRM3. Ces deux derniers Ac démontrent des résultats tout aussi intéressants jusqu'à maintenant.

Finalement, nous avons démontré que les ARA étaient détectés chez 31% des patients dans la première année du traitement par RTX. Ils n'affectaient pas l'atteinte d'une rémission clinique à long terme et n'étaient pas une contre-indication à recevoir des perfusions subséquentes de RTX. Toutefois, un petit groupe de patients avec ARA et à risque de rechute a été identifié. En effet, trois patients avec ARA présentaient la combinaison d'un taux sérique de RTX indétectable, d'une déplétion incomplète des LB CD19<sup>+</sup> et d'une persistance des Ac anti-Dsg3, et deux d'entre eux ont rechuté après 12 mois de traitement. Il est probable que leurs ARA étaient fonctionnels et menaient à l'inefficacité des perfusions d'entretien aux mois 12 et 18. Tel que démontré avec les patients ensuite recrutés dans l'étude ancillaire, ce mécanisme ne semble toutefois pas le seul impliqué dans les rechutes à long terme et de plus amples études cliniques avec une plus grande cohorte sera nécessaire pour mieux caractériser le rôle potentiel des ARA. Éventuellement, il sera aussi important de vérifier le mécanisme d'action potentiel de ces ARA et de vérifier leur réelle capacité à inhiber la fonction du RTX.

## Références bibliographiques

1. Fuchs, E., *Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address*. Curr Top Dev Biol, 2016. **116**: p. 357-74.
2. Johnson, J.L., N.A. Najor, and K.J. Green, *Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(11): p. a015297.
3. Eckhart, L., et al., *Cell death by cornification*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3471-3480.
4. Mese, G., G. Richard, and T.W. White, *Gap junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2516-24.
5. Garrod, D.R., A.J. Merritt, and Z. Nie, *Desmosomal cadherins*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 537-45.
6. Cheng, X., Z. Den, and P.J. Koch, *Desmosomal cell adhesion in mammalian development*. Eur J Cell Biol, 2005. **84**(2-3): p. 215-23.
7. Green, K.J. and C.L. Simpson, *Desmosomes: new perspectives on a classic*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2499-515.
8. Buxton, R.S., et al., *Nomenclature of the desmosomal cadherins*. J Cell Biol, 1993. **121**(3): p. 481-3.
9. Collins, J.E., et al., *Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins): cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains*. J Cell Biol, 1991. **113**(2): p. 381-91.
10. Koch, P.J., et al., *Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris*. J Cell Biol, 1997. **137**(5): p. 1091-102.
11. Kitajima, Y., *New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease*. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2013. **29**(1): p. 1-13.
12. Hu, Z., et al., *Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 61-5.
13. Rajasekaran, S.A., et al., *Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(12): p. 3717-32.
14. Chidgey, M.A., J.P. Clarke, and D.R. Garrod, *Expression of full-length desmosomal glycoproteins (desmocollins) is not sufficient to confer strong adhesion on transfected L929 cells*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(4): p. 689-95.
15. Amagai, M., et al., *Extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) mediates weak homophilic adhesion*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(4): p. 609-15.
16. Marozzi, C., et al., *Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion*. J Cell Sci, 1998. **111** ( Pt 4): p. 495-509.

17. Chिताев, N.A. and S.M. Troyanovsky, *Direct Ca<sup>2+</sup>-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 1997. **138**(1): p. 193-201.
18. Ishii, K., et al., *Pemphigus vulgaris and foliaceus IgG autoantibodies directly block heterophilic trans-interaction between desmoglein and desmocollin*. J Invest Dermatol, 2020.
19. King, I.A., et al., *Cloning of the cDNA (DSC1) coding for human type 1 desmocollin and its assignment to chromosome 18*. Genomics, 1993. **18**(2): p. 185-94.
20. Schmidt, E., M. Kasperkiewicz, and P. Joly, *Pemphigus*. Lancet, 2019. **394**(10201): p. 882-894.
21. Kasperkiewicz, M., et al., *Pemphigus*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17026.
22. Jelti, L., et al., *Incidence and Mortality of Pemphigus in France*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(2): p. 469-473.
23. Di Zenzo, G., G. Zambruno, and L. Borradori, *Endemic pemphigus foliaceus: towards understanding autoimmune mechanisms of disease development*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(11): p. 2499-502.
24. Hammers, C.M. and J.R. Stanley, *Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 175-97.
25. Murrell, D.F., et al., *Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts*. J Am Acad Dermatol, 2020. **82**(3): p. 575-585.e1.
26. Saschenbrecker, S., et al., *Serological Diagnosis of Autoimmune Bullous Skin Diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1974.
27. Delavarian, Z., et al., *Evaluation of desmoglein 1 and 3 autoantibodies in pemphigus vulgaris: correlation with disease severity*. Journal of clinical and experimental dentistry, 2020. **12**(5): p. e440-e445.
28. Murrell, D.F., et al., *Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus*. J Am Acad Dermatol, 2008. **58**(6): p. 1043-6.
29. Hebert, V., et al., *Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(1): p. 31-37.
30. Mignard, C., 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.
31. Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley, *Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion*. Cell, 1991. **67**(5): p. 869-77.
32. Amagai, M., et al., *Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 919-26.
33. Beutner, E.H. and R.E. Jordon, *DEMONSTRATION OF SKIN ANTIBODIES IN SERA OF PEMPHIGUS VULGARIS PATIENTS BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENT STAINING*. Proc Soc Exp Biol Med, 1964. **117**: p. 505-10.
34. Kim, J.H., et al., *A Homozygous Nonsense Mutation in the DSG3 Gene Causes Acantholytic Blisters in the Oral and Laryngeal Mucosa*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(5): p. 1187-1190.

35. Samuelov, L., et al., *Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1244-1248.
36. Lovgren, M.L., et al., *Mutations in desmoglein 1 cause diverse inherited palmoplantar keratoderma phenotypes: implications for genetic screening*. Br J Dermatol, 2017. **176**(5): p. 1345-1350.
37. Sinha, A.A., *The genetics of pemphigus*. Dermatol Clin, 2011. **29**(3): p. 381-91, vii.
38. Tan, S.R., et al., *Pemphigus vulgaris induced by electrical injury*. Cutis, 2006. **77**(3): p. 161-5.
39. Brenner, S. and Y. Wohl, *A burning issue: burns and other triggers in pemphigus*. Cutis, 2006. **77**(3): p. 145-6.
40. Ruocco, V., et al., *Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies*. Clin Dermatol, 2013. **31**(4): p. 374-381.
41. Lee, E., et al., *Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris*. Hum Immunol, 2006. **67**(1-2): p. 125-39.
42. Sinha, A.A., et al., *A newly characterized HLA DQ beta allele associated with pemphigus vulgaris*. Science, 1988. **239**(4843): p. 1026-9.
43. Veldman, C.M., et al., *T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3883-92.
44. Yan, L., J.M. Wang, and K. Zeng, *Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis*. Br J Dermatol, 2012. **167**(4): p. 768-77.
45. Gao, J., et al., *Association Study and Fine-Mapping Major Histocompatibility Complex Analysis of Pemphigus Vulgaris in a Han Chinese Population*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(11): p. 2307-2314.
46. Hertl, M., et al., *Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(4): p. 388-92.
47. Eming, R., et al., *Pathogenic IgG antibodies against desmoglein 3 in pemphigus vulgaris are regulated by HLA-DRB1\*04:02-restricted T cells*. J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4391-9.
48. Hertl, M., R. Eming, and C. Veldman, *T cell control in autoimmune bullous skin disorders*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1159-66.
49. Vodo, D., O. Sarig, and E. Sprecher, *The Genetics of Pemphigus Vulgaris*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 226.
50. Vodo, D., et al., *Identification of a Functional Risk Variant for Pemphigus Vulgaris in the ST18 Gene*. PLoS Genet, 2016. **12**(5): p. e1006008.
51. Hertl, M., et al., *Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(1): p. 62-6.
52. Lin, M.S., et al., *Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris*. J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 31-40.
53. Aoki-Ota, M., et al., *Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 105-13.
54. Takahashi, H., et al., *T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(2): p. 324-30.

55. Futei, Y., et al., *Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus*. J Dermatol Sci, 2001. **26**(1): p. 55-61.
56. Veldman, C., et al., *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**(1): p. 635-42.
57. Armitage, R.J., et al., *Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines*. J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3671-80.
58. Heupel, W.M., et al., *Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1825-34.
59. Langenhan, J., et al., *Specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus requires the entire ectodomains of desmogleins*. Exp Dermatol, 2014. **23**(4): p. 253-9.
60. Rotzer, V., et al., *Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(1): p. 301-10.
61. Anhalt, G.J., et al., *Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease*. N Engl J Med, 1982. **306**(20): p. 1189-96.
62. Aoki-Ota, M., et al., *A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice*. Br J Dermatol, 2004. **151**(2): p. 346-54.
63. Kardos, M., et al., *Pemphigus vulgaris in pregnancy: analysis of current data on the management and outcomes*. Obstet Gynecol Surv, 2009. **64**(11): p. 739-49.
64. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
65. Ayatollahi, M., et al., *IgG4 as the predominant autoantibody in sera from patients with active state of pemphigus vulgaris*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2004. **18**(2): p. 241-2.
66. Spaeth, S., et al., *IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris*. Br J Dermatol, 2001. **144**(6): p. 1183-8.
67. Funakoshi, T., et al., *Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus*. Br J Dermatol, 2012. **167**(6): p. 1245-53.
68. Bhol, K., A. Mohimen, and A.R. Ahmed, *Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris*. Dermatology, 1994. **189 Suppl 1**: p. 85-9.
69. Dhandha, M.M., K. Seiffert-Sinha, and A.A. Sinha, *Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris*. Autoimmunity, 2012. **45**(7): p. 516-526.
70. Kricheli, D., et al., *The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives*. Br J Dermatol, 2000. **143**(2): p. 337-42.
71. Torzecka, J.D., et al., *Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development?* Arch Dermatol Res, 2007. **299**(5-6): p. 239-43.
72. Abasq, C., et al., *ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus*. Arch Dermatol, 2009. **145**(5): p. 529-35.
73. Belloni-Fortina, A., 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**: p. 187864.

74. Culton, D.A., et al., *Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity*. Journal of autoimmunity, 2008. **31** 4: p. 311-24.
75. Jeannin, P., et al., *IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3555-61.
76. Anhalt, G.J., et al., *Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice*. J Immunol, 1986. **137**(9): p. 2835-40.
77. Payne, A.S., et al., *Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 888-99.
78. Mascaro, J.M., Jr., et al., *Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **85**(1): p. 90-6.
79. Lo, A.S.-Y., 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**.
80. Ali, S., et al., *Serum and salivary IgG and IgA antibodies to desmoglein 3 in mucosal pemphigus vulgaris*. Br J Dermatol, 2016. **175**(1): p. 113-21.
81. Mentink, L.F., et al., *Coexistence of IgA antibodies to desmogleins 1 and 3 in pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus and paraneoplastic pemphigus*. Br J Dermatol, 2007. **156**(4): p. 635-41.
82. Nagel, A., et al., *Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3*. Clin Immunol, 2010. **134**(3): p. 320-30.
83. Yokouchi, M., et al., *Pathogenic epitopes of autoantibodies in pemphigus reside in the amino-terminal adhesive region of desmogleins which are unmasked by proteolytic processing of prosequence*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(9): p. 2156-66.
84. Sekiguchi, M., et al., *Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5439-48.
85. Warren, S.J., et al., *The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(1): p. 104-8.
86. Yamagami, J., et al., *Antibodies to the desmoglein 1 precursor proprotein but not to the mature cell surface protein cloned from individuals without pemphigus*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5615-21.
87. Tsunoda, K., et al., *Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2170-8.
88. Berkowitz, P., et al., *Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(3): p. 738-40.
89. Jolly, P.S., et al., *p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 8936-41.
90. Rubenstein, D.S. and L.A. Diaz, *Pemphigus antibody induced phosphorylation of keratinocyte proteins*. Autoimmunity, 2006. **39**(7): p. 577-86.



91. Sokol, E., et al., *Large-Scale Electron Microscopy Maps of Patient Skin and Mucosa Provide Insight into Pathogenesis of Blistering Diseases*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(7): p. 1763-1770.
92. Stahley, S.N., et al., *Super-Resolution Microscopy Reveals Altered Desmosomal Protein Organization in Tissue from Patients with Pemphigus Vulgaris*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(1): p. 59-66.
93. Berkowitz, P., et al., *Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23778-84.
94. Berkowitz, P., et al., *p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(34): p. 12855-60.
95. Mao, X., et al., *MAPKAP kinase 2 (MK2)-dependent and -independent models of blister formation in pemphigus vulgaris*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(1): p. 68-76.
96. Cirillo, N., et al., *Pemphigus vulgaris autoimmune globulin induces Src-dependent tyrosine-phosphorylation of plakophilin 3 and its detachment from desmoglein 3*. Autoimmunity, 2014. **47**(2): p. 134-40.
97. Hammers, C.M. and J.R. Stanley, *Recent Advances in Understanding Pemphigus and Bullous Pemphigoid*. J Invest Dermatol, 2020. **140**(4): p. 733-741.
98. Saito, M., et al., *Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50696.
99. Spindler, V., et al., *Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(1): p. 32-37.
100. Stanley, J.R., et al., *A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein I binds the same polypeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus*. J Immunol, 1986. **136**(4): p. 1227-30.
101. Mahoney, M.G., et al., *Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris*. J Clin Invest, 1999. **103**(4): p. 461-8.
102. Stanley, J.R. and M. Amagai, *Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome*. N Engl J Med, 2006. **355**(17): p. 1800-10.
103. Wu, H., et al., *Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 31-5.
104. Hanakawa, Y., N. Matsuyoshi, and J.R. Stanley, *Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(1): p. 27-31.
105. Cozzani, E., et al., *Are clinical phenotype and autoantibody profile always concordant in pemphigus? A study in a cohort of pemphigus patients*. Eur J Dermatol, 2013. **23**(1): p. 40-8.
106. Sharma, V.K., et al., *Evaluation of desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris*. Int J Dermatol, 2006. **45**(5): p. 518-22.
107. Zagorodniuk, I., et al., *A comparison of anti-desmoglein antibodies and indirect immunofluorescence in the serodiagnosis of pemphigus vulgaris*. Int J Dermatol, 2005. **44**(7): p. 541-4.
108. Yoshida, K., et al., *Cutaneous type pemphigus vulgaris: a rare clinical phenotype of pemphigus*. J Am Acad Dermatol, 2005. **52**(5): p. 839-45.

109. Gheisari, M., et al., *Cutaneous-type of Pemphigus Vulgaris*. J Am Acad Dermatol, 2020.
110. Carew, B. and G. Wagner, *Cutaneous pemphigus vulgaris with absence of desmoglein 1 autoantibodies. An example of the extended desmoglein compensation theory*. Australas J Dermatol, 2014. **55**(4): p. 292-5.
111. Koga, H., et al., *Five Japanese cases of antidesmoglein 1 antibody-positive and antidesmoglein 3 antibody-negative pemphigus with oral lesions*. Br J Dermatol, 2012. **166**(5): p. 976-80.
112. Jamora, M.J., D. Jiao, and J.C. Bystryk, *Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris*. J Am Acad Dermatol, 2003. **48**(6): p. 976-7.
113. Sardana, K., V.K. Garg, and P. Agarwal, *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, 2013. **168**(3): p. 669-74.
114. Vu, T.N., et al., *The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus*. Arch Dermatol, 1998. **134**(8): p. 971-80.
115. Grando, S.A., *Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on keratinocyte functions*. Handb Exp Pharmacol, 2012(208): p. 429-50.
116. Grando, S.A., *Cholinergic control of epidermal cohesion*. Exp Dermatol, 2006. **15**(4): p. 265-82.
117. Grando, S.A., *Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities*. Autoimmunity, 2012. **45**(1): p. 7-35.
118. Kalantari-Dehaghi, M., et al., *Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57587.
119. Kalantari-Dehaghi, M., et al., *New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology*. Exp Dermatol, 2011. **20**(2): p. 154-6.
120. Sinha, A.A. and T. Sajda, *The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the "Super Compensation Hypothesis"*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 218.
121. Lakshmi, M.J.D., et al., *Correlation of antimuscarinic acetylcholine receptor antibody titers and antidesmoglein antibody titers with the severity of disease in patients with pemphigus*. J Am Acad Dermatol, 2017. **76**(5): p. 895-902.
122. Nguyen, V.T., A. Ndoye, and S.A. Grando, *Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity*. Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1377-91.
123. Marchenko, S., et al., *Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3695-704.
124. Chernyavsky, A., et al., *Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptosis*. Int Immunopharmacol, 2015. **29**(1): p. 76-80.
125. Amber, K.T., M. Valdebran, and S.A. Grando, *Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1190.

126. Chernyavsky, A.I., et al., *Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13804-12.
127. Chernyavsky, A., et al., *Synergy among non-desmoglein antibodies contributes to the immunopathology of desmoglein antibody-negative pemphigus vulgaris*. J Biol Chem, 2019. **294**(12): p. 4520-4528.
128. Chen, J., Z. Den, and P.J. Koch, *Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 17): p. 2844-9.
129. Ohyama, B., 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**(4): p. 1158-68.
130. Ishii, K., et al., *Isolation of pathogenic monoclonal anti-desmoglein 1 human antibodies by phage display of pemphigus foliaceus autoantibodies*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(4): p. 939-48.
131. Spindler, V., et al., *Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30556-64.
132. Ivars, M., et al., *The involvement of ADAM10 in acantholysis in mucocutaneous pemphigus vulgaris depends on the autoantibody profile of each patient*. Br J Dermatol, 2019.
133. Den, Z., et al., *Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 3): p. 482-9.
134. Lotti, R., et al., *Development of a Desmocollin-3 Active Mouse Model Recapitulating Human Atypical Pemphigus*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1387.
135. Hashimoto, T., et al., *Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus*. J Invest Dermatol, 1997. **109**(2): p. 127-31.
136. Tateishi, C., et al., *Antidesmocollin-1 antibody-positive, antidesmoglein antibody-negative pemphigus herpetiformis*. J Am Acad Dermatol, 2010. **63**(1): p. e8-10.
137. Hong, W.J., T. Hashimoto, and S.C. Kim, *A Case of Pemphigus Herpetiformis with Only Immunoglobulin G Anti-Desmocollin 3 Antibodies*. Ann Dermatol, 2016. **28**(1): p. 102-6.
138. Nakamura, Y., et al., *A case of pemphigus herpetiformis-like atypical pemphigus with IgG anti-desmocollin 3 antibodies*. Br J Dermatol, 2014. **171**(6): p. 1588-90.
139. Kozłowska, A., et al., *Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3*. J Am Acad Dermatol, 2003. **48**(1): p. 117-22.
140. Ansai, O., et al., *Case of pemphigus herpetiformis with immunoglobulin G autoantibodies against desmocollin-3*. J Dermatol, 2017. **44**(1): p. 104-105.
141. Tay, Y.E., S.S.J. Lee, and Y.L. Lim, *Pemphigus herpetiformis with autoantibodies to desmocollins 1, 2 and 3*. Clin Exp Dermatol, 2018. **43**(3): p. 360-362.
142. Ueda, A., et al., *Unique herpetiform bullous dermatosis with IgG antibodies to desmocollins 1/3 and LAD-1*. Br J Dermatol, 2013. **169**(3): p. 719-21.
143. Rafei, D., et al., *IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion*. Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 718-23.
144. Saruta, H., et al., *Two cases of pemphigus vegetans with IgG anti-desmocollin 3 antibodies*. JAMA Dermatol, 2013. **149**(10): p. 1209-13.

145. Tani, N., et al., *Reduced IgG anti-desmocollin autoantibody titre and concomitant improvement in a patient with pemphigus vegetans*. Eur J Dermatol, 2018. **28**(2): p. 232-233.
146. Hatano, Y., et al., *Atypical pemphigus with exclusively anti-desmocollin 3-specific IgG antibodies*. Eur J Dermatol, 2012. **22**(4): p. 560-2.
147. Hashimoto, T., et al., *A case of pemphigus vulgaris showing reactivity with pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) and desmocollins*. J Invest Dermatol, 1995. **104**(4): p. 541-4.
148. Makino, T., et al., *Detection of IgG antibodies to desmoglein 3 and desmocollins 2 and 3 in mucosal dominant-type pemphigus vulgaris with severe pharyngalgia and hyperemia of the bulbar conjunctiva*. Eur J Dermatol, 2015. **25**(6): p. 619-20.
149. Kamiya, K., et al., *Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3*. J Dermatol, 2016. **43**(4): p. 429-31.
150. Iranzo, P., et al., *Nonclassical pemphigus with exclusively IgG anti-desmocollin 3-specific antibodies*. Australas J Dermatol, 2019. **60**(3): p. e217-e219.
151. Geller, S., et al., *Childhood Pemphigus Foliaceus with Exclusive Immunoglobulin G Autoantibodies to Desmocollins*. Pediatr Dermatol, 2016. **33**(1): p. e10-3.
152. Leventhal, J.S., et al., *Image Gallery: Juvenile autoimmune pemphigus presenting with diffuse gingival hypertrophy and antibodies against desmocollin 3*. Br J Dermatol, 2017. **177**(5): p. e226.
153. Muller, R., et al., *Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus*. Clin Exp Dermatol, 2009. **34**(8): p. 898-903.
154. Meltzanidou, P., et al., *Detection of IgG Autoantibodies against Desmocollin-3 in Greek Patients with Pemphigus*. Acta Dermatovenerol Croat, 2019. **27**(1): p. 8-10.
155. Mindorf, S., et al., *Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus*. Exp Dermatol, 2017. **26**(12): p. 1267-1270.
156. Hisamatsu, Y., et al., *The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus*. Br J Dermatol, 2004. **151**(1): p. 73-83.
157. Ishii, N., et al., *Anti-desmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus*. Br J Dermatol, 2015. **173**(1): p. 59-68.
158. Ohzono, A., et al., *Clinical and immunological findings in 104 cases of paraneoplastic pemphigus*. Br J Dermatol, 2015. **173**(6): p. 1447-52.
159. Mao, X., et al., *Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris*. Am J Pathol, 2010. **177**(6): p. 2724-30.
160. Kridin, K., *Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities*. Immunol Res, 2018. **66**(2): p. 255-270.
161. Harman, K.E., et al., *British Association of Dermatologists' guidelines for the management of pemphigus vulgaris 2017*. Br J Dermatol, 2017. **177**(5): p. 1170-1201.
162. Didona, D., et al., *Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1418.
163. Atzmony, L., et al., *The role of adjuvant therapy in pemphigus: A systematic review and meta-analysis*. J Am Acad Dermatol, 2015. **73**(2): p. 264-71.
164. Frampton, J.E., *Rituximab: A Review in Pemphigus Vulgaris*. Am J Clin Dermatol, 2020. **21**(1): p. 149-156.

165. Boross, P. and J.H. Leusen, *Mechanisms of action of CD20 antibodies*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(6): p. 676-90.
166. Merrill, J.T., et al., *Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(1): p. 222-33.
167. Gottenberg, J.E., et al., *Comparative effectiveness of rituximab, abatacept, and tocilizumab in adults with rheumatoid arthritis and inadequate response to TNF inhibitors: prospective cohort study*. Bmj, 2019. **364**: p. l67.
168. Granqvist, M., et al., *Comparative Effectiveness of Rituximab and Other Initial Treatment Choices for Multiple Sclerosis*. JAMA Neurol, 2018. **75**(3): p. 320-327.
169. Chao, S.H., et al., *Efficacy and safety of rituximab in autoimmune and microangiopathic hemolytic anemia: a systematic review and meta-analysis*. Exp Hematol Oncol, 2020. **9**: p. 6.
170. Tsai, H.M., *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Beyond Empiricism and Plasma Exchange*. Am J Med, 2019. **132**(9): p. 1032-1037.
171. Riley, J.K. and M.X. Sliwkowski, *CD20: a gene in search of a function*. Semin Oncol, 2000. **27**(6 Suppl 12): p. 17-24.
172. Reff, M.E., et al., *Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20*. Blood, 1994. **83**(2): p. 435-45.
173. Cerny, T., et al., *Mechanism of action of rituximab*. Anticancer Drugs, 2002. **13 Suppl 2**: p. S3-10.
174. Salopek, T.G., S. Logsetty, and E.E. Tredget, *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**(5): p. 785-8.
175. Wang, H.H., et al., *Efficacy of rituximab for pemphigus: a systematic review and meta-analysis of different regimens*. Acta Derm Venereol, 2015. **95**(8): p. 928-32.
176. Joly, P., et al., *A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus*. N Engl J Med, 2007. **357**(6): p. 545-52.
177. Lunardon, L., et al., *Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients*. Arch Dermatol, 2012. **148**(9): p. 1031-6.
178. Cianchini, G., et al., *Therapy with rituximab for autoimmune pemphigus: results from a single-center observational study on 42 cases with long-term follow-up*. J Am Acad Dermatol, 2012. **67**(4): p. 617-22.
179. Kim, T.H., et al., *Adjuvant rituximab treatment for pemphigus: A retrospective study of 45 patients at a single center with long-term follow up*. J Dermatol, 2017. **44**(6): p. 615-620.
180. Colliou, N., et al., *Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response*. Sci Transl Med, 2013. **5**(175): p. 175ra30.
181. Zhou, S., et al., *Autoreactive B Cell Differentiation in Diffuse Ectopic Lymphoid-Like Structures of Inflamed Pemphigus Lesions*. Journal of Investigative Dermatology, 2020. **140**(2): p. 309-318.e8.
182. Nomura, H. and M. Amagai, *Is Local Production of Autoantibodies in Skin Lesions Relevant in Pemphigus?* Journal of Investigative Dermatology, 2020. **140**(2): p. 275-276.

183. Yuan, H., et al., *Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(11): p. 2362-2370.
184. Nishifuji, K., et al., *Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(1): p. 88-94.
185. Hammers, C.M., et al., *Persistence of anti-desmoglein 3 IgG(+) B-cell clones in pemphigus patients over years*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(3): p. 742-749.
186. Joly, P., 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**(10083): p. 2031-2040.
187. Hebert, V. and P. Joly, *Rituximab in pemphigus*. Immunotherapy, 2018. **10**(1): p. 27-37.
188. Amber, K.T. and M. Hertl, *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, 2015. **29**(4): p. 777-82.
189. Werth, V.P., et al., *Rituximab versus Mycophenolate Mofetil in Patients with Pemphigus Vulgaris*. N Engl J Med, 2021. **384**(24): p. 2295-2305.
190. Weng, W.K. and R. Levy, *Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(21): p. 3940-7.
191. Maloney, D.G., B. Smith, and A. Rose, *Rituximab: mechanism of action and resistance*. Semin Oncol, 2002. **29**(1 Suppl 2): p. 2-9.
192. Vermeire, S., et al., *Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease*. Therap Adv Gastroenterol, 2018. **11**: p. 1756283x17750355.
193. Wong, U. and R.K. Cross, *Primary and secondary nonresponse to infliximab: mechanisms and countermeasures*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017. **13**(10): p. 1039-1046.
194. Buch, M.H., et al., *Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(6): p. 909-20.
195. van Vollenhoven, R.F., et al., *Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials*. J Rheumatol, 2010. **37**(3): p. 558-67.
196. Lebrun, C., et al., *Only Follow-Up of Memory B Cells Helps Monitor Rituximab Administration to Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders*. Neurol Ther, 2018. **7**(2): p. 373-383.
197. Dunn, N., et al., *Rituximab in multiple sclerosis: Frequency and clinical relevance of anti-drug antibodies*. Mult Scler, 2018. **24**(9): p. 1224-1233.
198. Boyer-Suavet, S., et al., *Neutralizing Anti-Rituximab Antibodies and Relapse in Membranous Nephropathy Treated With Rituximab*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 3069.
199. Thurlings, R.M., et al., *Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(2): p. 409-12.
200. Albert, D., et al., *Variability in the biological response to anti-CD20 B cell depletion in systemic lupus erythaematosus*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(12): p. 1724-31.
201. Bertrand, Q., et al., *Anti-rituximab antibodies in pediatric steroid-dependent nephrotic syndrome*. Pediatric Nephrology, 2021.

202. Schmidt, E., et al., *Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus*. Clin Immunol, 2009. **132**(3): p. 334-41.
203. Lunardon, L. and A.S. Payne, *Inhibitory human antichimeric antibodies to rituximab in a patient with pemphigus*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(3): p. 800-3.
204. Mahaweni, N.M., et al., *A comprehensive overview of FCGR3A gene variability by full-length gene sequencing including the identification of V158F polymorphism*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15983.
205. Wu, J., et al., *A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1059-70.
206. Dall'Ozzo, S., et al., *Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4664-9.
207. Anolik, J.H., et al., *The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(2): p. 455-9.
208. Farag, S.S., et al., *Fc γRIIIa and Fc γRIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1472-4.
209. Weng, W.K., W.K. Weng, and R. Levy, *Immunoglobulin G Fc receptor polymorphisms do not correlate with response to chemotherapy or clinical course in patients with follicular lymphoma*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(9): p. 1494-500.
210. Cho, A., et al., *Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease*. Cell Reports, 2019. **28**(4): p. 909-922.e6.
211. Chernyavsky, A., K.G. Patel, and S.A. Grando, *Mechanisms of synergy of autoantibodies to M3 muscarinic acetylcholine receptor and secretory pathway Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase isoform 1 in patients with non-desmoglein pemphigus vulgaris*. Int Immunopharmacol, 2020. **80**: p. 106149.
212. Hudemann, C., et al., *Human Desmocollin 3–Specific IgG Antibodies Are Pathogenic in a Humanized HLA Class II Transgenic Mouse Model of Pemphigus*. Journal of Investigative Dermatology, 2021.
213. Li, J., et al., *Role of autoantibodies against the linker subdomains of envoplakin and periplakin in the pathogenesis of paraneoplastic pemphigus*. Chin Med J (Engl), 2009. **122**(5): p. 486-95.
214. Smith, K.G.C., et al., *Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment*. Arthritis & Rheumatism, 2006. **54**(9): p. 2970-2982.
215. Krishna, M. and S.G. Nadler, *Immunogenicity to Biotherapeutics - The Role of Anti-drug Immune Complexes*. Frontiers in immunology, 2016. **7**: p. 21-21.
216. Wincup, C., et al., *Presence of anti-rituximab antibodies predicts infusion-related reactions in patients with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2019. **78**(8): p. 1140-1142.

## **Annexes**

### **Annexe 1 : Brevet international déposé le 26 août 2021**

#### **METHODS FOR DETECTING THE PRESENCE OF PEMPHIGUS-SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN A SAMPLE**

---

##### **FIELD OF THE INVENTION:**

The present invention is in the field of medicine, in particular dermatology and immunology.

##### **BACKGROUND OF THE INVENTION:**

Pemphigus is a group of rare autoimmune diseases that causes blistering of the skin and mucous membranes, including mouth, nose, throat, eyes, and genitals. The type of disease depends on what layer in the skin the blisters form and where they are located on the body, which include pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF). For instance, PV is the most common type of pemphigus in the United States and Europe. Flaccid blisters appear on erythematous or normal-appearing skin and mucous membranes. The sores almost always start in the mouth. The blisters of PV form within the deep layer of the epidermis, and are often painful. Blistered skin becomes so fragile that it may peel off by rubbing a finger on it. The blisters normally heal without scarring, but pigmented spots (spots where skin appears darker than the surrounding skin) may remain for a number of months. Without treatment, PV leads to significant skin erosions, resulting in high morbidity and mortality. It is known that the type of autoantibodies typically defines the type of disease. In particular, the discovery that autoantibodies targeting desmoglein (Dsg) 1 and Dsg3 cause blister formation has been potentially the most critical event in understanding pemphigus pathogenesis to date. Patients



with pemphigus have various combinations of autoantibodies to keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtype M3 (CHRM3), the secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase isoform 1 (SPCA1), and desmocollin 3 (DSC3). However, there is still a need to characterize these autoantibodies and optimize their detection for diagnosis and disease monitoring.

#### SUMMARY OF THE INVENTION:

The present invention is defined by the claims. In particular, the present invention relates to methods for detecting the presence of pemphigus-specific autoantibodies in a sample.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The first object of the present invention relates to a method for detecting the presence of pemphigus-specific autoantibodies in a subject comprising the steps of:

- a) placing a sample obtained from the subject, in a single assay receptacle, in the presence of particles belonging to either of the 3 different groups, a first group of particles being conjugated to DSC3 polypeptide, a second group of particles being conjugated to a SPCA1 polypeptide and a third group of particles being conjugated to a CHRM3 polypeptide
- b) incubating the mixture under conditions which allow the formation of immunocomplexes on particles,
- c) eliminating the immunoglobulins which have not bound to the particles, and
- d) detecting the immunocomplexes of step b) on the plurality of particles, whereby the presence or absence of anti-DSC3 autoantibodies, anti-SPCA1 autoantibodies or anti-CHRM3 autoantibodies is revealed.

As used herein, the term "**sample**" refer to a biological sample obtained for the purpose of in vitro evaluation. Typical biological samples to be used in the method according to the invention are blood samples (e.g. whole blood sample or serum sample).

As used herein, the term “**blood sample**” means any blood sample derived from the subject. Collections of blood samples can be performed by methods well known to those skilled in the art. In some embodiments, the blood sample is a serum sample or a plasma sample.

As used herein, the term “**antigen**” refers to a substance that can cause the immune system to produce an antibody response against it, and possibly can trigger a biological reaction when an antibody binds to it under the appropriate *in vivo* conditions. The term antigen as used herein shall refer to a whole target molecule or a fragment of such molecule recognized by an antigen binding site. Specifically, substructures of an antigen, e.g. a polypeptide, generally referred to as “**epitopes**”, which are immunologically relevant, may be recognized by an antibody. Thus, in some embodiments, the antigen of the present invention comprises at least one epitope. Methods for identifying and characterizing epitopes are well known in the art. Typically, said methods include but are not limited to epitope prediction algorithms and MHC associated peptidome identified by mass spectrometry (MS).

As used herein, the term “**antibody**”, “**immunoglobulin**” or “**Ig**” has its general meaning in the art and relates to proteins of the immunoglobulin superfamily. The immunoglobulins are characterized by a structural domain, i.e., the immunoglobulin domain, having a characteristic immunoglobulin (Ig) fold. The term encompasses secretory immunoglobulins. Immunoglobulins generally comprise several chains, typically two identical heavy chains and two identical light chains which are linked via disulfide bonds. These chains are primarily composed of immunoglobulin domains, including the VL domain (light chain variable domain), the CL domain (light chain constant domain), the VH domain (heavy chain variable domain) and the CH domains (heavy chain constant domains) CH1, optionally a hinge region, CH2, CH3, and optionally CH4. There are five main heavy chain classes (or isotypes) which determine the functional activity of an antibody molecule: mu ( $\mu$ ) for IgM, delta ( $\delta$ ) for IgD, gamma ( $\gamma$ ) for IgG, alpha ( $\alpha$ ) for IgA and epsilon ( $\epsilon$ ) for IgE. In the context of the invention, the immunoglobulin may be an IgM, IgD, IgG, IgA or IgE. Preferably, the immunoglobulin is an IgG. As well-known from

the skilled person, the IgG isotype encompasses four subclasses: the subclasses IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. The IgA isotype encompasses 2 subclasses: IgA1 and IgA2 immunoglobulins.

As used herein, the term "**autoantibody**" refers to an antibody produced by a subject, where the antibody is directed against one or more 'self antigens (e.g., antigens that are native to the individual, e.g., an antigen on a cell or tissue, or an endogenous peptide or protein).

As used herein, the term "**particle**" has its general meaning in the art and refers to a particle from 1 nm to 1000 nm, preferably from 100 to 500 nm and even more preferably from 350 to 450 nm in size. In some embodiments, the size of the particle is about 400 nm. A particle may typically be spherical, though the shape is not limited to that of a sphere and may include other shapes like spheroid, irregular particles, cubes, irregular cubes, and disks. According to the present invention the term "**particle**" is interchangeable with the term "**bead**".

In some embodiments, the particle of the present invention is made of an organic polymer. Organic polymers encompass, but are not limited to, polystyrene, poly(vinyl acetate), poly(methylstyrene), poly(acrylamide), poly(acrylonitrile), poly(vinyl chloride), poly(butyl acrylate), poly(acrylic acid), copolymers of styrene and C1-C4alkyl (meth)acrylate, copolymers of styrene and acrylamide, copolymers of styrene and acrylonitrile, copolymers of styrene and vinyl acetate, copolymers of acrylamide and C1-C4 alkyl (meth)acrylates, copolymers from acrylonitrile and C1-C4 alkyl (meth)acrylate, copolymers of acrylonitrile and acrylamide, terpolymers from styrene, acrylonitrile and acrylamide, poly(methyl methacrylate), poly(ethyl methacrylate), copolymers styrene/butadiene, styrene/acrylic acid, styrene/vinylpyrrolidone and butadiene/acrylonitrile, or methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) copolymer (MPEG-PLA). Polymer particles can be crosslinked or not. For instance, organic particles include, but are not limited to, nylon (for example marketed by ATOCHEM), polyethylene powders (for example marketed by PLAST LABOR), poly-2-alanine powders, polyfluorinated powders such as polytetrafluoroethylene (for example marketed by DUPONT DE NEMOURS), acrylic copolymer powders (for example marketed by DOW CHEMICA), polystyrene powders (for example

marketed by PRESPERESE), polyester powders, expanded microspheres in thermoplastic material (for example marketed by EXPANCEL), microballs of silicon resins (for example marketed by TOSHIBA), synthetic hydrophilic polymer powders such as polyacrylates (for example marketed by MATSUMOTO), acrylic polyamides (for example marketed by ORIS), insoluble polyurethanes (for example marketed by TOSHNU), porous microspheres of cellulose, micro- or particles of PTFE (polytetrafluoroethylene).

In some embodiments, the particles are selected to have a variety of properties useful for particular experimental formats. For example, particles can be selected that remain suspended in a solution of desired viscosity or to readily precipitate in a solution of desired viscosity.

In some embodiments, the particles are magnetic and coded.

Particles also can be coded for identification purposes, such as by bar codes, luminescence, fluorescence and the like. A variety of coded particles are well known to those skilled in the art, and include for example, Luminex<sup>®</sup> and Cyvera<sup>®</sup> coded particles. With regard to coded particles, each particle can include a unique code, preferably, the coded particles contain a code other than that present in the detectable tag used to detect the presence or amount of modified substrate (e.g., support-bound product portion, free product portion, or modified support-bound substrate). The code can be embedded (for example, within the interior of the particle) or otherwise attached to the particle in a manner that is stable through hybridization and analysis. The code can be provided by any detectable means, such as by holographic encoding, by a fluorescence property, color, shape, size, light emission, quantum dot emission and the like to identify particle and thus the capture probes immobilized thereto. For example, the particles may be encoded using optical, chemical, physical, or electronic tags. Examples of such coding technologies are optical bar codes fluorescent dyes, or other means. One exemplary platform utilizes mixtures of fluorescent dyes impregnated into polymer particles as the means to identify each member of a particle set to which a specific capture probe has been immobilized. Another exemplary platform uses holographic barcodes to identify cylindrical glass particles. For

example, Chandler et al. (U.S. Pat. No. 5,981,180) describes a particle-based system in which different particle types are encoded by mixtures of various proportions of two or more fluorescent dyes impregnated into polymer particles. Soini (U.S. Pat. No. 5,028,545) describes a particle-based multiplexed assay system that employs time-resolved fluorescence for particle identification. Fulwyler (U.S. Pat. No. 4,499,052) describes an exemplary method for using particle distinguished by color and/or size. U.S. Patent Publication Nos. 2004-0179267, 2004-0132205, 2004-0130786, 2004-0130761, 2004-0126875, 2004-0125424, and 2004-0075907 describe exemplary particles encoded by holographic barcodes. U.S. Pat. No. 6,916,661 describes polymeric particles (e.g., microparticles) that are associated with particles that have dyes that provide a code for the particles.

As used herein, the term “**magnetic particle**” encompasses any particle having at least some magnetic characteristic, e.g., ferromagnetic, paramagnetic, and superparamagnetic property. A magnetic particle can include magnetic materials such as iron, nickel, and cobalt, as well as metal oxides such as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ,  $\text{Mn}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CoO}$ ,  $\text{NiO}$ , and  $\text{CoMnP}$ . In some embodiments, the magnetic particle contains, or fully consists of, a polymeric magnetic material. Polymeric magnetic material includes for example, material in which the magnetic material is mixed with polymeric material and magnetic material that is coated with polymeric material. Preferably the magnetic material is only one component of the microparticle whose remainder consists of a polymeric material to which the magnetically responsive material is affixed (see coded particles below). Exemplary methods for the preparation of or composition of magnetic particles are described in, e.g., U.S. Pat. Nos. 6,773,812 and 6,280,618.

As used herein, the terms “**polypeptide**”, “**peptide**” and “**protein**” are used interchangeably herein to refer to polymers of amino acids of any length. Polypeptides when discussed in the context of the present invention refer to the respective intact polypeptide, or any fragment or genetically engineered derivative thereof, which retains the desired biochemical function and/or conformation of the intact protein.

As used herein, the term “**DSC3**” has its general meaning in the art and refers to the Desmocollin-3. DSC3 is a component of intercellular desmosome junctions and is involved in the interaction of plaque proteins and intermediate filaments mediating cell-cell adhesion. The term is also known as Cadherin family member 3 or HT-CP.

In some embodiments, the DSC3 polypeptide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:1

MCGVFGATKG KRFPELAQQ NLIISNTEAP GDDRVCSANG FMTQTTNNS QGFCGTMGSG M  
KNGGQETIEM MKGGNQTLES CRGAGHHHTL DSCRGGHTEV DNCRYTYSEW HSFTQPRLGE  
KLHRCNQNE RMP SQDYVLT YNYEGRGSPA GSVGCCSEKQ EEDGLDFLNN LEPKFITLAE ACTKR

As used herein, the term “**SPCA1**” has its general meaning in the art and refers to secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase isoform 1. SPCA1 is a magnesium-dependent enzyme that catalyses the hydrolysis of ATP coupled with the transport of the calcium.

In some embodiments, the SPCA1 polypeptide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:2.

SEQ ID NO:2

MVVTVTALG VMRMVKKRAI VKKLPIVETL GCCNVICSDK TGTLTKNEMT VTHIFTS DGL H  
AEVTGVGYNQ FGEVIVDGDV VHGFYNPAVS RIVEAGCVCN DAVIRNNTLM GKPTGALIA  
LAMKMGLDGL QQDYIRKAEY PFSSEQWMA VKCVHRTQQD RPEICFMKGA YEQVIKYCTT  
YQSKGQTLTL TQQQRDVYQQ EKARMGSAGL RVLALASGPE LGQLTFLGLV GIIDPPRTGV KEAVTTLIAS  
GVSIMITGD SQETAVAIAS RLGLYSKTSQ SVSGEEIDAM DVQQLSQIVP KVAVFYRASP RHKMKIISL  
QKNGSVVAMT GDGVN

The term “**CHRM3**” has its general meaning in the art and refers to the muscarinic acetylcholine receptor M3. The muscarinic acetylcholine receptor mediates various cellular responses, including inhibition of adenylate cyclase, breakdown of phosphoinositides and modulation of potassium channels through the action of G proteins.

In some embodiments, the CHRM3 polypeptide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO:3

RIYKETEKRT KELAGLQASG TEAETENFVH PTGSSRSCSS YELQQQSMKR SNRRKYGRCH FWFTTKSWKP  
SSEQMDQDHS SSSWNNNDA AASLENSASS DEEDIGSETR AIYSIVLKLKLP GHSTILNSTK LPSSDNLQVP  
EEELGMVDLE RKADKLQAQK SVDDGGGSPFK SFSKLPISLE SAVDTAKTSD VNSSVGKSTA TLPLSFKEAT  
LAKRFALKTR SQITKRKRMS LVKEKAAQT

In some embodiments, the polypeptide is attached to the surface of the particle by any conventional method well known in the art, such as described in Hermanson, Greg T. Bioconjugate techniques. Academic press, 2013. In some embodiments, 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC)- N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo NHS) reactions are used for conjugating the polypeptides to the particles. In some embodiments, the particle is conjugated to an avidin moiety that can create an avidin-biotin complex with the biotinylated polypeptides and the particles. Additional, appropriate cross-linking agents for use in the invention include a variety of agents that are capable of reacting with a functional group present on a surface of the particle. Reagents capable of such reactivity include homo- and hetero-bifunctional reagents, many of which are known in the art. Heterobifunctional reagents are preferred. A typical bifunctional cross-linking agent is N-succinimidyl(4-iodoacetyl) aminobenzoate (SIAB). However, other crosslinking agents, including, without limitation, dimaleimide, dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB), N-succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) and 6-hydrazinonicotinamide (HYNIC) may

also be used. For further examples of cross-linking reagents, see, e.g., S. S. Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking," CRC Press (1991), and G. T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press (1995).

In some embodiments, the receptacle may be any solid container, for example a test tube, a microplate well or a reaction cuvette made of polypropylene.

In some embodiments, the elimination of the unbound reagents may be carried out by any technique known to those skilled in the art, such as e.g. washing by means of repeated centrifugation steps.

As used herein the term "**immunocomplex**" refers to the complex formed between the pemphigus-specific autoantibodies of the subject and their specific antigen, i.e. the polypeptide that is conjugated to the particle.

The presence and amount of the immunocomplexes may be detected by methods known in the art, including label-based and label-free detection. In some embodiments, the method of the present invention includes use of a secondary antibody that is coupled to an indicator reagent comprising a signal generating compound.

In some embodiments, the secondary antibody has specificity for a particular immunoglobulin.

In some embodiments, the secondary antibody is an anti-human IgG antibody, including anti-IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies.

In some embodiments, the secondary antibody is an anti-human IgA1 or IgA2 antibody.

In some embodiments, the antibody having specificity for a particular type immunoglobulin is a rabbit or goat antibody.



In some embodiments, the antibody of the present invention is a monoclonal antibody or a polyclonal antibody.

Indicator reagents include chromogenic agents, catalysts such as enzyme conjugates, fluorescent compounds such as fluorescein and rhodamine, chemiluminescent compounds such as dioxetanes, acridiniums, phenanthridiniums, ruthenium, and luminol, radioactive elements, direct visual labels, as well as cofactors, inhibitors and magnetic particles. Examples of enzyme conjugates include alkaline phosphatase, horseradish peroxidase and beta-galactosidase. In some embodiments, the secondary antibody is conjugated to phycoerythrin.

Methods for detecting the particle identity codes, e.g., a fluorescent code, are known in the art and are described below. Examples of systems that read (detect or analyze) multiplex assay signals from Luminex beads include, e.g., the Luminex xMAP 100 and xMAP 200 instruments or the Bio-Plex 100 and Bio-Plex 200 from BioRad instruments. Another method for detecting and/or separating particle sets based on ID codes is flow cytometry. Methods of and instrumentation for flow cytometry are known in the art, and those that are known can be used in the practice of the present invention. Flow cytometry, in general, involves the passage of a suspension of the particles as a stream past a light beam and electro-optical sensors, in such a manner that only one particle at a time passes through the region. As each particle passes this region, the light beam is perturbed by the presence of the particle, and the resulting scattered and fluorescent light are detected. The optical signals are used by the instrumentation to identify the subgroup to which each particle belongs, along with the presence and amount of label, so that individual assay results are achieved. Descriptions of instrumentation and methods for flow cytometry are known in the art and include, e.g., McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Methods in Cell Biology* 42, Part B (Academic Press, 1994); McHugh et al., "Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation," *Clinical Flow Cytometry*, Bauer, K. D., et al., eds. (Baltimore, Md., USA: Williams and Williams, 1993), pp. 535-544;

Lindmo et al, "Immunometric Assay Using Mixtures of Two Particle Types of Different Affinity," J. Immunol. Meth. 126: 183-189 (1990); McHugh, "Flow Cytometry and the Application of Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays," Immunochemica 5: 116 (1991); Horan et al., "Fluid Phase Particle Fluorescence Analysis: Rheumatoid Factor Specificity Evaluated by Laser Flow Cytometry," Immunoassays in the Clinical Laboratory, 185-189 (Liss 1979); Wilson et al, "A New Microsphere-Based Immunofluorescence Assay Using Flow Cytometry," J. Immunol. Meth. 107: 225-230 (1988); Fulwyler et al., "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," Meth. Cell Biol. 33: 613-629 (1990); Coulter Electronics Inc., United Kingdom Patent No. 1,561,042 (published Feb. 13, 1980); and Steinkamp et al., Review of Scientific Instruments 44(9): 1301-1310 (1973).

Typically, the detecting step thus involved the use of detector.

As used herein, the term "**detector**" is intended to mean a device or apparatus that converts the energy of contacted photons into an electrical response. For instance, the term can include an apparatus that produces an electric current in response to impinging photons such as in a photodiode or photomultiplier tube. A detector can also accumulate charge in response to impinging photons and can include, for example, a charge coupled device. In particular, the detector involves the use of a radiation source.

As used herein, the term "**radiation source**" is intended to mean an origin or generator of propagated electromagnetic energy. The term can include any illumination sources including, for example, those producing electromagnetic radiation in the ultraviolet, visible and/or infrared regions of the spectrum. A radiation source can include, for example, a lamp such as an arc lamp or quartz halogen lamp, or a laser.

As used herein, the term "**laser**" is intended to mean a source of radiation produced by light amplification by stimulated emission of radiation. The term can include, for example, an ion laser such as argon ion or krypton ion laser, helium neon laser, helium cadmium laser, dye laser

such as a rhodamine 6G laser, YAG laser or diode laser. These and other lasers useful in the apparatus of the invention are known in the art as described, for example, in Shapiro, Practical Flow Cytometry, 3rd Ed. Wiley-Liss, New York (1995).

In some embodiments, the detector is a flow cytometer.

As used herein, the term “**flow cytometer**” is intended to mean a device or apparatus having a means for aligning the particles in a sample stream and a detector aligned such that the particles individually enter a zone of detection. A sample stream can include any mobile phase that passes particles in single file including, for example, a fluid stream or fluid jet.

In some embodiments, the method of the present invention comprises the steps wherein the sample is separated in 3 aliquots, and each aliquot is then placed in a single assay receptacle, wherein the first aliquot is placed in presence of a first of particles being conjugated to a DSC3 polypeptide, the second aliquot is placed in presence of particles being conjugated to a SPCA1 polypeptide and the third aliquot is placed in presence of particles being conjugate to a CHRM3 polypeptide.

As used herein, the term “**aliquot**” refers to a subset of the sample.

In said embodiments, the presence or absence of anti-DSC3 autoantibodies, anti-SPCA1 autoantibodies and or anti-CHRM3 autoantibodies is revealed for on sample.

In some embodiments, the method of the present invention comprises the steps of:

a) placing a sample obtained from the subject, in a single assay receptacle, in the presence of a plurality of particles belonging to at least 2 different groups, a first group of particles being conjugated to a SPCA1 polypeptide and a second group of particles being conjugated to a CHRM3 polypeptide

- b) incubating the mixture under conditions which allow the formation of immunocomplexes on particles,
  - c) eliminating the immunoglobulins which have not bound to the particles,
  - d) incubating the mixture of step b) with at least one secondary antibody that is coupled to an indicator reagent and has specificity for a particular immunoglobulin (e.g. an anti-human IgG or anti-IgA antibody),
  - e) eliminating the secondary antibodies not bound to the immunocomplexes of step b),
- and
- f) simultaneously detecting, by means of a detector capable of differentiating the particles mentioned above, the immunocomplexes of step d) on each particle, whereby the presence or absence of anti-SPCA1 autoantibodies or anti-CHRM3 autoantibodies is revealed.

In said embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for simultaneously detecting the presence or absence of anti-SPCA1 autoantibodies (IgG and/or IgA) and anti-CHRM3 autoantibodies (IgG and/or IgA). In some embodiments, the groups of said particles differ from one another by their identity codes (e.g. fluorophores) as described above. In said embodiments, the method of the present invention thus involves the use of a multiplex technology.

As used herein, the term “**multiplex technology**” is the collective term for a variety of techniques which can assess multiple immunoglobulin specificities simultaneously on small volumes of sample. The advantage of multiplex technology is that it is able to provide very rapid test times and very high throughput of samples.

In some embodiments, the method of the present invention involves an addressable laser bead immunoassay (ALBIA), which is commercially available on Luminex™-based platforms. For instance, ALBIA is a semi-quantitative homogenous fluorescence-based microparticle immunoassay that can be used for the simultaneous detection of several immunoglobulins (e.g. up to 10 immunoglobulins). Each antigen (i.e. DSC3, SPCA1 or CHRM3) is covalently coupled to a

set of distinct uniform size colour-coded particles. The sample is then incubated with the particles in the single assay receptacle or may be separated in 3 aliquots as described above and thus are contacted with group of particles. The particles are then washed and then incubated with secondary anti-human IgG conjugated to a fluorescent label (e.g. phycoerythrin). After washing again, the particles are analysed on a system in which separate lasers identified antigen by bead colour and quantified the antibody by measuring the fluorescence of the fluorescent label. Said quantification thus indicated the level of the detected autoantibodies.

In some embodiments, the method of the present invention further involves placing a fourth aliquot, in a single assay receptacle, in the presence of a fourth group of particles being conjugated to a desmoglein polypeptide.

In some embodiments, the fourth group of particles is conjugated to a DSG1 polypeptide.

In some embodiments, the fourth group of particles is conjugated to a DSG3 polypeptide.

In some embodiments, the method of the present invention further involves i) placing a fourth aliquot, in a single assay receptacle, in the presence of a fourth group of particles being conjugated to a desmoglein polypeptide and ii) placing a fifth aliquot, in a single assay receptacle, in the presence of a fifth group of particles being conjugated to a desmoglein polypeptide

In some embodiments, the fourth group of particles is conjugated to a DSG1 polypeptide.

In some embodiments, the fifth group of particles is conjugated to a DSG3 polypeptide.

As used herein, the term “DSG1” has its general meaning in the art and refers to the desmoglein

1. An exemplary amino acid sequence for DSG1 is represented by SEQ ID NO:4.

SEQ ID NO:4 >sp|Q02413|DSG1\_HUMAN Desmoglein-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG1  
PE=1 SV=2

>sp|Q02413|DSG1\_HUMAN Desmoglein-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG1 PE=1 SV=2  
MDWSFFRVVAMLFIFLVVVEVNSEFRIQVRDYNTKNGTIKWHSIRRQKREWIKFAAACREGEDNSKRNPIAKI  
HSDCAANQQVTYRISGVGIDQPPYGIFVINQKTGEINITSIVDREVTFFIYCRLNSMGQDLERPLELRVRL  
DINDNPPVFSMATFAGQIEENSANANTLVMILNATDADEPNLNSKIAFKIIRQEPSDSPMFIINRNTGEIRTM  
NNFLDREQYGQYALAVRGSDRDGGADGMSAECECNIKILDVNDNIPYMEQSSYTIEIQENTLNSNLEIRVIDL  
DEEFANWMAVIFISGNEGNWFEIEMNERTNVGILKVVKPLDYEAMQSLQLSIGVRNKAEFHHSIMSQYKL  
KASISVTVLNVIEGPVFRPGSKTYVVTGNMGSNDKVGDFVATDLDTGRPSTTVRYVMGNNPADLLAVDSR  
TGKLT LKNKVTKEQYNMLGGKYQGTILSIDDNLQRTCTGTININIQSFGNDDRTNTEPNTKITTNTGRQESTSS  
TNYDTSTTSTDSSQVYSSEPGNGAKDLLSDNVHFGPAGIGLLIMGFLVLGLVPFLMICCCDGGAPRSAAGFEP  
VPECSDGAIHSWAVEGPQPEPRDITVIPQIPPDNANIIECIDNSGVYTNEYGGREMQLGGGERMTGFELTE  
GVKTSGMPEICQEYSGTLRRNSMRECREGGLNMNFMESYFCQKAYAYADEDEGRPSNDCLLIYDIEGVGSPA  
GSVGCCSFIGEDLDDSFLDTLGPKFKKLADISLGKESYPLDPSWPPQSTEPVCLPQETEPVVS GHPPISP HFGT  
TTVISESTYPSGPGVLHPKPILDPLGYGNVTVTESYTTSDLKPSVHVHDNRPASNVVVTERVVGPIGADLHG  
MLEMPDLRDGSNVIVTERVIAPSSSLPTSLTIHHPRESSNVVVTERVIQPTSGMIGLSMHPELANAHNVIVTE  
RVVSGAGVTGISGTTGISGGIGSSGLVGTSMGAGSGALSGAGISGGGIGLSSLGGTASIGHMRSSSDHFNQT  
IGSASPSTARSRITKYSTVQYSK

As used herein, the term “DSG3” has its general meaning in the art and refers to the desmoglein 3. An exemplary amino acid sequence for DSG3 is represented by SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO:5 >sp|P32926|DSG3\_HUMAN Desmoglein-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG3  
PE=1 SV=2

>sp|P32926|DSG3\_HUMAN Desmoglein-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG3 PE=1 SV=2  
MMGLFPRTTGALAI FVVVILVHGELRIETKGQYDEEEMTMQQA KRRQKREWVKFAKPCREGEDNSKRNPIA  
KITS DYQATQKITYRISGVGIDQPPFGIFVVDKNTGDINITAIVDREETPSFLITCRALNAQGLDVEKPLILTVKILD  
INDNPPVFSQQIFMGEIEENSASNSLVMILNATDADEPNHLNSKIAFKIVSQEPAGTPMFLLSRNTGEVRTLTN  
SLDREQASSYRLVVSGADKDGEGSTQCECNIKVKDVNDNFPMFRDSQYSARIEENILSSELLRFQVTDLDEEY  
TDNWLAVYFFTS GNEGNWFEIQTDPRTNEGILKVVKALDYEQLQSVKLSIAVKNKAEFHQSVISRYRVQSTPV  
TIQVINVREGIAFRPASKTFTVQKGISSKLVLDYILGTYQAIDEDTNKAASN VKYVMGRNDGGYLMIDSKTAEIK

FVKNMNRDSTFIVNKTITAEVLAIDEYTGKTSTGTVYVRVPDFNDNCPTAVLEKDAVCSSSPSVVVSARTLNNR  
YTGPYTFALEDQPVKLPVWSITTLNATSALLRAQEQIPPGVYHISLVLTDSQNNRCEMPRSLTLEVCQCDNR  
GICGTSYPTTSPGTRYGRPHSGRLGPAAIIGLLLLLGLLLLLLAPLLLLLTCDCGAGSTGGVTGGFIPVPDGSEGTHQ  
WGIEGAHPEDKEITNICVPPVTANGADFMESSEVCTNTYARGTAVEGTSGMEMTTKGAATESGGAAGFAT  
GTVSGAASGFGAATGVGICSSGQSGTMRTRHSTGGTNKDYADGAISMNFLDSYFSQKAFACAEEDDGQEA  
NDCLLIYDNEGADATGSPVGSVGCCSFIADDDSLDSLGPFKFKLAEISLGVDGEGKEVQPPSKDSGYGIESC  
GHPIEVQQTGFVKCQTLSGSQGASALSTSGSVQPAVSIPDPLQHGNLYVTETYSASGSLVQPSTAGFDPLLTQ  
NVIVTERVICPISSVPGNLAGPTQLRGSHTMLCTEDPCSRLI

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for detecting the presence or absence of anti-DSG1 autoantibodies (IgG and/or IgA), anti-DSG3 autoantibodies (IgG and/or IgA), anti-DSC3 autoantibodies (IgG and/or IgA), anti-SPCA1 autoantibodies (IgG and/or IgA) or anti-CHRM3 autoantibodies (IgG and/or IgA).

The method of the present invention is particularly suitable for the diagnosis of pemphigus and more particularly for the diagnosis of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus.

As used herein, the term “**pemphigus vulgaris**” or “**PV**” has its general meaning in the art and refers to an acquired, rare, chronic, disabling, and potentially life-threatening autoimmune vesiculobullous disorder, characterized by mucocutaneous erosions or blisters. The disease is caused by pathogenic antibodies directed against desmoglein 1 and 3, which are members of the desmosomal cadherin family. The *in vivo* binding of these anti-desmoglein autoantibodies (mainly IgG4 and IgG1) leads to the loss of adhesion between keratinocytes resulting in the formation of intra-epidermal blisters. These blisters eventually lead to erosions in the skin which, prior to steroid therapy, resulted in significant mortality.

As used herein, the term “**pemphigus foliaceus**” or “**PF**” has its general meaning in the art and refers to the second most common type of pemphigus. It is an autoimmune skin disorder

characterized by the loss of intercellular adhesion of keratinocytes in the upper parts of the epidermis (acantholysis), resulting in the formation of superficial blisters.

In some embodiments, the method of diagnosis described herein is applied to a subject who presents symptoms of PV or PF without having undergone the routine screening to rule out all possible causes for PV or PF. The methods described herein can be part of the routine set of tests performed on a subject who presents symptoms of PV or PF such as painful blisters that start in the mouth or skin areas, skin blisters near the surface of the skin that come and go, as well as oozing, crusting, or peeling at the blister site. The method of the present invention can be carried out in addition of other diagnostic tools such as histology.

The method of the present invention is also particularly suitable for determining whether a subject suffering from PV or PF achieves a response with a treatment.

The method is thus particularly suitable for discriminating responder from non-responder.

As used herein the term “**responder**” in the context of the present disclosure refers to a subject that will achieve a response, i.e. a subject who is under remission and more particularly a subject who does not suffer from blisters. As used herein the term “**non-responder**” refers to a subject for whom the disease does not show reduction or improvement after the treatment (e.g. the blisters remains stable or increases).

In particular, detecting the absence of the autoantibodies indicates that the patient achieve a response with the treatment.

The method of the present invention is also particularly suitable for determining whether a subject is at risk of relapse after a treatment.



As used herein, the term "**risk**" in the context of the present invention, relates to the probability that an event will occur over a specific time period and can mean a subject's "absolute" risk or "relative" risk. Absolute risk can be measured with reference to either actual observation post-measurement for the relevant time cohort, or with reference to index values developed from statistically valid historical cohorts that have been followed for the relevant time period. Relative risk refers to the *ratio* of absolute risks of a subject compared either to the absolute risks of low risk cohorts or an average population risk, which can vary by how clinical risk factors are assessed. Odds ratios, the proportion of positive events to negative events for a given test result, are also commonly used (odds are according to the formula  $p/(1-p)$  where  $p$  is the probability of event and  $(1-p)$  is the probability of no event) to no-conversion. "Risk evaluation" or "evaluation of risk" in the context of the present invention encompasses making a prediction of the probability, odds, or likelihood that an event or disease state may occur, the rate of occurrence of the event or conversion from one disease state to another. Risk evaluation can also comprise prediction of future clinical parameters, traditional laboratory risk factor values, or other indices of relapse, either in absolute or relative terms in reference to a previously measured population. The methods of the present invention may be used to make continuous or categorical measurements of the risk of conversion, thus diagnosing and defining the risk spectrum of a category of subjects defined as being at risk of conversion.

As used herein, the term "**relapse**" refers to the return of signs and symptoms of a disease after a subject has enjoyed a remission after a treatment. Thus, if initially the target disease is alleviated or healed, or progression of the disease was halted or slowed down, and subsequently the disease or one or more characteristics of the disease resume (e.g. blisters), the subject is referred to as being "relapsed." Typically, the treatment is an immunosuppressive treatment.

In particular detection of the presence of anti-SPCA1 autoantibodies and/or anti-CHRM3 autoantibodies indicates that the patient is at risk of relapse.

According to the present invention, the treatment consists in any method or drug that could be suitable for the treatment of PV or PF.

In some embodiments, the treatment consists in an antibody depleting strategy, which typically include plasma exchange, plasmapheresis or immunoadsorption.

In some embodiments, the treatment consists in administering immunoglobulins (e.g. by intravenous route).

In some embodiments, the treatment is an immunosuppressive treatment.

As used herein, the term “**immunosuppressive treatment**” refers to any substance capable of producing an immunosuppressive effect, e.g., the prevention or diminution of the immune response and in particular the prevention or diminution of the production of Ig. Immunosuppressive drugs include, without limitation Prednisone, Dexamethasone, Rituximab, Mycophenolate mofetil, Azathioprine, and in more refractory cases, Cyclophosphamide, and Methotrexate

In some embodiments, the immunosuppressive drug is a corticosteroid.

As used, the term “**corticosteroid**” has its general meaning in the art and refers to class of active ingredients having a hydrogenated cyclopentoperhydrophenanthrene ring system endowed with an anti-inflammatory activity. Corticosteroid drugs typically include cortisone, cortisol, hydrocortisone (11 $\beta$ ,17-dihydroxy, 21-(phosphonoxy)-pregn-4-ene, 3,20-dione disodium), dihydrocortisone, dexamethasone (21-(acetyloxy)-9-fluoro-1 $\beta$ ,17-dihydroxy-16 $\alpha$ -methylpregna-1,4-diene-3,20-dione), and highly derivatized steroid drugs such as beconase (beclomethasone dipropionate, which is 9-chloro-11- $\beta$ , 17,21, trihydroxy-16 $\beta$ -methylpregna-1,4 diene-3,20-dione 17,21-dipropionate). Other examples of corticosteroids include flunisolide, prednisone, prednisolone, methylprednisolone, triamcinolone, deflazacort and betamethasone.

corticosteroids, for example, cortisone, hydrocortisone, methylprednisolone, prednisone, prednisolone, betamethasone, beclomethasone dipropionate, budesonide, dexamethasone sodium phosphate, flunisolide, fluticasone propionate, triamcinolone acetonide, betamethasone, fluocinolone, fluocinonide, betamethasone dipropionate, betamethasone valerate, desonide, desoximetasone, fluocinolone, triamcinolone, triamcinolone acetonide, clobetasol propionate, and dexamethasone.

In some embodiments, the treatment consists of administering a B cell depleting agent.

As used herein, the term “**B cell depleting agent**” refers to any agent that is capable of triggering lymphodepletion of B cells. In some embodiments, the B cell depleting agent is an antibody having specificity for CD20. Examples of antibodies having specificity for CD20 include: “C2B8” which is now called “Rituximab” (U.S. Pat. No. 5,736,137, expressly incorporated herein by reference), a chimeric pan-B antibody targeting CD20; the yttrium-[90]-labeled 2B8 murine antibody designated “Y2B8” or “Ibritumomab Tiuxetan” ZEVALIN® (U.S. Pat. No. 5,736,137, expressly incorporated herein by reference), a murine IgG1 kappa mAb covalently linked to MX-DTPA for chelating to yttrium-[90]; murine IgG2a “B1,” also called “Tositumomab,” optionally labeled with radioactive 131I to generate the “1311-B1” antibody (iodine 131 tositumomab, BEXXAR™) (U.S. Pat. No. 5,595,721, expressly incorporated herein by reference); murine monoclonal antibody “1F5” (Press et al. Blood 69 (2):584-591 (1987) and variants thereof including “framework patched” or humanized 1F5 (WO03/002607, Leung, S.; ATCC deposit HB-96450); murine 2H7 and chimeric 2H7 antibody (U.S. Pat. No. 5,677,180, expressly incorporated herein by reference); humanized 2H7, also known as ocrelizumab (PRO-70769); Ofatumumab (Arzerra), a fully human IgG1 against a novel epitope on CD20 huMax-CD20 (Genmab, Denmark; WO2004/035607 (U.S. Ser. No. 10/687,799, expressly incorporated herein by reference)); AME-133 (ocaratuzumab; Applied Molecular Evolution), a fully-humanized and optimized IgG1 mAb against CD20; A20 antibody or variants thereof such as chimeric or humanized A20 antibody (cA20, hA20, respectively) (U.S. Ser. No. 10/366,709, expressly incorporated herein by reference, Immunomedics); and monoclonal antibodies L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 or NU-B2

available from the International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al, In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)). Further, suitable antibodies include e.g. antibody GA101 (obinutuzumab), a third generation humanized anti-CD20-antibody of Biogen Idec/Genentech/Roche. Moreover, BLX-301 of Biolex Therapeutics, a humanized anti CD20 with optimized glycosylation or Veltuzumab (hA20), a 2nd-generation humanized antibody specific for CD20 of Immunomedics or DXL625, derivatives of veltuzumab, such as the bispecific hexavalent antibodies of IBC Pharmaceuticals (Immunomedics) which are comprised of a divalent anti-CD20 IgG of veltuzumab and a pair of stabilized dimers of Fab derived from milatuzumab, an anti-CD20 mAb enhanced with InNexus' Dynamic Cross Linking technology, of Inexus Biotechnology both are humanized anti-CD20 antibodies are suitable. Further suitable antibodies are BM-ca (a humanized antibody specific for CD20 (Int J. Oncol. 2011 February; 38(2):335-44)), C2H7 (a chimeric antibody specific for CD20 (Mol Immunol. 2008 May; 45(10):2861-8)), PRO131921 (a third generation antibody specific for CD20 developed by Genentech), Reditux (a biosimilar version of rituximab developed by Dr Reddy's), PBO-326 (a biosimilar version of rituximab developed by Probiomed), a biosimilar version of rituximab developed by Zenotech, TL-011 (a biosimilar version of rituximab developed by Teva), CMAB304 (a biosimilar version of rituximab developed by Shanghai CP Guojian), GP-2013 (a biosimilar version of rituximab developed by Sandoz (Novartis)), SAIT-101 (a biosimilar version of rituximab developed by Samsung BioLogics), a biosimilar version of rituximab developed by Intas Biopharmaceuticals, CT-P10), a biosimilar version of rituximab developed by Celltrion), a biosimilar version of rituximab developed by Biocad, Ublituximab (LFB-R603, a transgenically produced mAb targeting CD20 developed by GTC Biotherapeutics (LFB Biotechnologies)), PF-05280586 (presumed to be a biosimilar version of rituximab developed by Pfizer), Lymphomun (Bi-20, a trifunctional anti-CD20 and anti-CD3 antibody, developed by Trion Pharma), a biosimilar version of rituximab developed by Natco Pharma, a biosimilar version of rituximab developed by iBio, a biosimilar version of rituximab developed by Gedeon Richter/Stada, a biosimilar version of rituximab developed by Curaxys, a biosimilar version of rituximab developed by Coherus Biosciences/Daiichi Sankyo, a biosimilar version of rituximab developed by BioXpress, BT-D004 (a biosimilar version of rituximab developed by Protheon), AP-052 (a

biosimilar version of rituximab developed by Aprogen), a biosimilar version of ofatumumab developed by BioXpress, MG-1106 (a biosimilar version of rituximab developed by Green Cross), IBI-301 (a humanized monoclonal antibody against CD20 developed by Innovent Biologics), BVX-20 (a humanized mAb against the CD20 developed by Vaccinex), 20-C2-2b (a bispecific mAb-IFNalpha that targets CD20 and human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) developed by Immunomedics), MEDI-552 (developed by MedImmune/AstraZeneca), the anti-CD20/streptavidin conjugates developed by NeoRx (now Poniard Pharmaceuticals), the 2nd generation anti-CD20 human antibodies developed by Favril (now MMRGlobal), TRU-015, an antibody specific for CD20 fragment developed by Trubion/Emergent BioSolutions, as well as other preclinical approaches by various companies and entities. All aforementioned publications, references, patents and patent applications are incorporated by reference in their entirety. All antibodies disclosed therein may be used within the present invention.

A further object of the present invention relates to a kit for performing the method of the present invention. The kit comprises one or more plurality of particles as above described and means for determining the immunocomplexes. Reagents for particular types of assays can also be provided in kits of the invention. Thus, the kits can include different groups of particles each identified by a specific identity, plates that comprises the single assay receptacles (e.g. a multiwell plate), and secondary antibodies as described above. In some embodiments, the kits comprise a device such as a detector as described above. The groups of particles, the plate, and the devices are useful for performing the immunoassay of the present invention. In addition, the kits can include various diluents and buffers, labelled conjugates or other agents for the detection of the specifically immunocomplexes, and other signal-generating reagents, such as enzyme substrates, cofactors and chromogens. Other components of a kit can easily be determined by one of skill in the art.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

## FIGURES:

**Figure 1.** Schematic representation of the ALBIA technique used to detect and quantify the auto-antibodies in pemphigus patients. The antigens are either DSC3, SPCA1 or CHR3.

**Figure 2.** Anti-DSC3 auto-antibodies serum level in (A) total IgG, (B) IgA1 and (C) IgA2 in pemphigus patients (n=146) compared to healthy donors (HD) (n=100), and serum level of anti-SPCA1 (D-F) and anti-CHR3 (G-I). The positivity cut-off value, which is calculated with the mean of 100 HD + 2 (IgG anti-SPCA1 and IgG anti-CHR3) or 3 (IgG and IgA anti-DSC3, IgA anti-SPCA1 and IgA anti-CHR3) standard deviation, is indicated as horizontal dotted line and mean values are shown as solid bars.

**Figure 3.** Evaluation of in vitro pathogenicity of anti-DSC3 antibodies from pemphigus patients and anti-DSC3 immunized-mice. (A) Keratinocyte dissociation assay from one patient containing solely anti-DSC3 IgA which shown to be pathogenic in the absence of anti-DSG1 and anti-DSG3. (B) keratinocyte dissociation assays using sera from two patients with mucocutaneous type of PV containing anti-DSG3 IgG and anti-DSC3 IgA1 (patient D), and anti-DSG3 and anti-DSC3 IgG (patient E). A decrease of the pathogenicity was observed after pre-adsorption of anti-DSC3 Abs. (C) The dissociation assay was performed with sera from two patients (F and G) who presented a cutaneous type of PV containing anti-DSG1 IgG and anti-DSC3 IgA1. A decrease of serum pathogenicity was observed after pre-adsorption of anti-DSG3 Abs with recombinant DSC3. For A, B and C \* For healthy donor: n=9, \*\*The P-value is calculated in comparison to the healthy donor/negative control. (D) Mice were immunized with recombinant human DSC3 protein and antibodies were detected as of day 56. Purified IgG anti-DSC3 from immunized mice were shown to be pathogenic. DSC3, Desmocollin 3; DSG, Desmoglein; IFA, Incomplete Freund's Adjuvant; Ig, Immunoglobulin. \* The P-value is calculated in comparison to the non-immunized mice, \*\* For the purified IgG pre-adsorbed in anti-DSC3: n=1.

EXAMPLE:

## **Methods**

### ***Addressable laser bead immunoassay (ALBIA) test for the quantification of anti-DSC3, anti-SPCA1 and anti-CHRM3 auto-antibodies***

An ALBIA test was developed for each of these three proteins (**Figure 1**). It consisted of coupling human recombinant DSC3, SPCA1 or CHRM3 protein to fluorescent beads (Biorad) according to the manufacturer's protocol.

To quantify the auto-antibodies, 1000 coated beads were incubated in Multiscreen 96-well plates with 100µl of sera diluted at 1:37.5 for DSC3 and at 1:600 for SPCA1 and CHRM3 in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) with Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> and 1% fetal bovine serum for 2h on a plate shaker and then washed. Then, beads were incubated for 1h in the same conditions with 100µl of specific biotinylated mouse anti-human secondary antibodies (SouthernBiotech) at the following dilution: anti-IgG at 1:2000, anti-IgA1 at 1:125 and anti-IgA2 at 1:200, and washed. Finally, beads were incubated for 15 min with 50µL of streptavidin-R-phycoerythrin (Biorad) diluted at 1:400. The mean fluorescence intensity (MFI) was determined on a Bio-Plex apparatus using Manager software version 4.0 (Bio-Rad). Negative control (no serum, secondary antibody only) and positive control (highly positive serum) were included in every assay.

The auto-antibodies level were determined with the following formula that was previously described:  $(MFI^{\text{serum}}/MFI^{\text{positive control}}) \times 100$ , in which the positive control is a patient highly positive in anti-DSC3, anti-SPCA1 or anti-CHRM3 auto-antibodies. These patients serve as positive controls for each antigen and are used on every 96-well plates. Their level was arbitrarily set to 100 arbitrary units (AU)/mL.

## **Results**

The ALBIA test developed for the 3 proteins successfully detected and quantified the presence of auto-antibodies directed against each of these antigens in pemphigus patients (**Figure 2**).

For DSC3, IgA (IgA1 and/or IgA2) anti-DSC3 were detected in 23/146 (16%) patients compared to 3/100 (3%) in healthy donors ( $P=0.0012$ ) and IgG anti-DSC3 were detected in 10/146 (7%) patients compared to 2/100 (2%) in healthy donors ( $P=0.13$ ). Therefore, the main isotype identified was IgA, and the IgA1 titers significantly decreased following the introduction of a treatment from  $188\pm 132$  AU/mL at day (D) 0 to  $40\pm 35$  AU/mL at D90 after treatment ( $P=0.0015$ ), and the IgA2 titers from  $26\pm 26$  AU/mL at D0 to  $0.9\pm 1.4$  AU/mL at D90 ( $P=0.07$ ).

For SPCA1, IgG anti-SPCA1 were detected in 32/146 (22%) patients compared to 3/100 (3%) in healthy donors ( $P<0.0001$ ) and no IgA were detected. The IgG titers significantly decreased following the introduction of a treatment from  $88\pm 26$  AU/mL at D0 to  $25\pm 21$  AU/mL at D90 ( $P<0.0001$ ).

For CHR3, IgG anti-CHR3 were detected in 45/146 (31%) patients compared to 2/100 (2%) in healthy donors ( $P<0.0001$ ) and IgA anti-CHR3 were detected in 15/146 (10%) patients compared to 3/100 (3%) in healthy donors ( $P=0.07$ ). The titers significantly decreased following the introduction of a treatment from  $60\pm 27$  AU/mL at D0 to  $31\pm 21$  AU/mL at D90 ( $P<0.0001$ ).

The detection and quantification of anti-SPCA1 and/or anti-CHR3 were also associated to a risk of relapse in the first year following the treatment using rituximab as a first-line agent. Amongst patients with anti-SPCA1 at D0, 5/10 (50%) patients relapsed in the first year compared to 4/36 (11%) patients who were negative in anti-SPCA1 ( $P=0.0056$ ). Amongst patients with anti-CHR3 at D0, 4/12 (33%) patients relapsed in the first year compared to 5/34 (15%) patients who were negative in anti-SPCA1 ( $P=0.16$ ). Therefore, the presence of either of these autoantibodies was a predictor of relapse and could help monitor disease evolution.

REFERENCES:



Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

#### CLAIMS:

1. A method for detecting the presence of pemphigus-specific autoantibodies in a subject comprising the steps of:

a) placing a sample obtained from the subject, in a single assay receptacle, in the presence of particles belonging to either of the 3 different groups, a first group of particles being conjugated to DSC3 polypeptide, a second group of particles being conjugated to a SPCA1 polypeptide and a third group of particles being conjugated to a CHRM3 polypeptide,

b) incubating the mixture under conditions which allow the formation of immunocomplexes on particles,

c) eliminating the immunoglobulins which have not bound to the particles, and

d) detecting the immunocomplexes of step b) on the plurality of particles, whereby the presence or absence of anti-DSC3 autoantibodies, anti-SPCA1 autoantibodies or antiCHRM3 autoantibodies is revealed.

2. The method of claim 1 wherein the sample is a blood sample.

3. The method of claim 1 wherein the particles are magnetic and coded.

4. The method of claim 1 wherein the DSC3 polypeptide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:1.

5. The method of claim 1 wherein the SPCA1 polypeptide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:2.

6. The method of claim 1 wherein the CHR3 polypeptide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:3.

7. The method of claim 1 wherein a secondary antibody that is coupled to an indicator reagent comprising a signal generating compound is used.

8. The method of claim 7 wherein the secondary antibody is an anti-human IgG antibody, including anti-IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies.

9. The method of claim 7 wherein the secondary antibody is an anti-human IgA1 or IgA2 antibody.

10. The method of claim 1 that comprises the steps wherein the sample is separated in 3 aliquots, and each aliquot is then placed in a single assay receptacle, wherein the first aliquot is placed in presence of a first of particles being conjugated to a DSC3 polypeptide, the second aliquot is placed in presence of particles being conjugated to a SPCA1 polypeptide and the third aliquot is placed in presence of particles being conjugate to a CHR3 polypeptide.

11. The method of claim 1 that comprises the steps of:

a) placing a sample obtained from the subject, in a single assay receptacle, in the presence of a plurality of particles belonging to at least 2 different groups, a first group of particles being conjugated to a SPCA1 polypeptide and a second group of particles being conjugated to a CHR3 polypeptide,

b) incubating the mixture under conditions which allow the formation of immunocomplexes on particles,

c) eliminating the immunoglobulins which have not bound to the particles,

d) incubating the mixture of step b) with at least one secondary antibody that is coupled to an indicator reagent and has specificity for a particular immunoglobulin (e.g. an antihuman IgG or anti-IgA antibody),

e) eliminating the secondary antibodies not bound to the immunocomplexes of step b),  
and

f) simultaneously detecting, by means of a detector capable of differentiating the particles mentioned above, the immunocomplexes of step d) on each particle, whereby the presence or absence of anti-SPCA1 autoantibodies or anti-CHRM3 autoantibodies is revealed.

12. The method of claim 1 that involves an addressable laser bead immunoassay (ALBIA).

13. Use of the method of claim 1 for the diagnosis of pemphigus and more particularly for the diagnosis of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus.

14. Use of the method of claim 1 for determining whether a subject suffering from PV or PF achieves a response with a treatment.

15. Use of the method of claim 1 for determining whether a subject is at risk of relapse after a treatment.

16. The use of claim 15 wherein detection of the presence of anti-SPCA1 autoantibodies and/or anti-CHRM3 autoantibodies indicates that the patient is at risk of relapse, in particular, in the first year following the treatment using a B cell depleting agent (e.g. rituximab) as a first-line agent.