

Université
de Toulouse

UNIVERSITE TOULOUSE III

PAUL SABATIER

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE 2021

THESE 2021/TOU3/2053

THESE

En vue de l'obtention du

DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Discipline : Biologie Médicale – Spécialité : Immunologie

MISE AU POINT DE TECHNIQUES DIAGNOSTIQUES DANS LA PEMPHIGOÏDE BULLEUSE : AUTOUR DE LA BP180

Présentée et soutenue publiquement par *Milhès Jean*

le 20 septembre 2021

Directeur de thèse : *Blancher, Antoine, PU-PH*

Co-directeur de thèse : *Fortenfant, Françoise, PH*

JURY

Président : *Ayyoub, Maha, PU-PH*

1^{er} assesseur : *Paul, Carle PU-PH*

2nd assesseur : *Konstantinou, Maria-Polina, PH*

3^e assesseur : *Bost, Chloé, AHU*

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020**

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Mâîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.
M. LE LOUEDEC F.
M. MOUMENI A.
M. PAGES A. Mme SALABERT A.S
Mme TRIBAUDEAU L.

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Remerciements :

Au professeur Antoine Blancher,

Qui a accepté de diriger cette thèse. Je le remercie particulièrement pour ses conseils, ses questions, sa franchise. Je le remercie également pour le temps qu'il a su me consacrer pendant ces quelques semestres passés au laboratoire d'immunologie. Il a su entretenir ma curiosité, et m'a guidé sur le chemin de la réflexion scientifique. Si je deviens un jour un biologiste et un immunologiste confirmés, c'est en partie à lui que je le devrai.

Au docteur Françoise Fortenfant,

Qui a co-dirigé cette thèse. Je la remercie particulièrement pour son encadrement, autant pendant cette thèse qu'au sein du secteur d'auto-immunité, pour tout ce qu'elle a su me transmettre sur le métier de biologiste, et pour son écoute attentive.

Au professeur Maha Ayyoub,

Qui a accepté de présider le jury. Je la remercie de se rendre disponible pour juger ce travail. Je regrette de ne pas avoir pu bénéficier de ses cours d'immunologie à la faculté de pharmacie.

Au professeur Carle Paul,

Qui a accepté d'être membre du jury. Je le remercie de se rendre disponible, et espère que le laboratoire d'immunologie et le service de dermatologie continueront à collaborer.

Au docteur Maria Polina Konstantinou,

Qui a accepté d'être membre du jury. Je la remercie d'avoir relu mon travail et d'assister à cette thèse malgré la distance. Je la remercie également pour son aide précieuse lors du recueil de données.

Au docteur Chloé Bost,

Qui a accepté d'être membre du jury, et de m'aider à corriger le manuscrit de cette thèse. Je la remercie particulièrement pour ses conseils, sa motivation et son entrain à mêler recherche scientifique et plaisir.

A tous les enseignants de la faculté de pharmacie, aux professeurs et maîtres de stages, aux scientifiques du CRCT, aux biologistes des laboratoires de Purpan et de Ranguel, qui seraient trop longs pour être cités,

Je vous remercie, car vous avez tous contribué à m'apprendre et me transmettre ce que je suis aujourd'hui.

A toutes les techniciennes du laboratoire d'auto-immunité, qui ont réalisé pour moi un bon nombre d'expériences, qui m'ont vu arriver tôt et partir tard, qui ont su me dire de

rentrer chez moi pour dormir, qui m'ont supporté pendant que je regardais par-dessus leur épaule pour leur demander ce qu'elles faisaient, et qui m'ont laissé un tabouret dans la salle de lecture du microscope,

A Isabelle, Carine, Laura, Laura, Céline, Florence, Estelle, Camille, Anaïs,
Merci pour tout.

A Cyril Clavel et Nathalie Jonca, à Carole, Séverine et Pauline de l'UDEAR,
Merci pour m'avoir accueilli dans votre bureau ou dans votre laboratoire, de m'avoir transmis vos connaissances, de m'avoir appris une technique qui était obscure pour moi, et d'avoir cultivé plusieurs séries de kératinocytes, sans rien demander en retour. Votre aide et votre bienveillance m'ont été très précieuses.

A tous mes co-internes, et particulièrement ceux avec qui j'ai passé un semestre à Bordeaux, et ceux avec qui j'ai partagé ces derniers mois,

A Chloé, Clément, Guillaume, Juliette, Noémie, Valentin,

A Caroline, Eva, Guillaume et Mathilde,

Merci pour votre soutien, pour votre écoute, pour toutes ces discussions sur le laboratoire et l'hôpital, mais aussi sur tous les autres sujets du monde.

A mes compagnons de la faculté de pharmacie, ceux que je croisais en cours, et ceux que je croisais le soir,

A ceux qui restent et qui sont aujourd'hui de vrais amis,

A Jean, Julien, Maxime, Yoann, et leurs conjointes,

Merci pour tous ces bons souvenirs, grâce auxquels je peux dire que j'ai bien profité de mes années étudiantes. Et merci pour tous les souvenirs que nous continueront à créer ensemble.

A mes amis de longue date, que je connais depuis très longtemps, et qui me connaissent tout autant,

A Tristan, Thomas, Samuel, à Julia et Isabelle,

Merci du fond du cœur, vous avez toujours été là, même dans les temps difficiles. Malgré la distance et le temps qui séparent parfois nos retrouvailles, nous nous retrouverons toujours. Merci pour tous ces souvenirs, pour toutes ces années.

A mes amis des scouts, avec qui j'ai grandi par intermittence,

A Manue, Hugues et Pierre,

Merci pour tous ces souvenirs, souvent associés à de la pluie, des tentes, des randonnées avec des sacs à dos plus lourds que nous. Le temps passe, mais nous continuons à nous retrouver, toujours avec plaisir, pour évoquer ces beaux souvenirs.

A mes cousins, mes cousines, mes oncles, mes tantes,

A toute ma grande famille qu'il serait impossible de nommer tant ils sont nombreux,

Merci pour toutes nos retrouvailles tous les étés, et tous ces souvenirs. Nous avons tous grandi, mais ce lien qui nous unit nous rassemblera toujours.

A mes grands parents,

Merci du fond du cœur, vous pouvez être fiers de vos enfants, mes parents, car ils ont fait un petit pharmacien passionné.

A ma mère,

Merci du fond du cœur, pour ton soutien, tes conseils, ton écoute, ton temps, ton sourire, pour tout. Aucun mot ne pourrait suffire, tu as été pour nous un rocher dans la tempête, et un soleil dans les moments de joie. Merci.

A mon père,

Merci pour tous ces moments passés ensemble. Si je suis devenu ce que je suis, c'est en partie grâce à ce que tu m'as transmis : la passion pour un travail tourné vers les autres, et la curiosité pour tous les sujets du monde.

A ma sœur, Sophie,

Merci pour ton sourire, pour tes appels, tes coups de gueule, nos disputes lorsque nous étions petits, et surtout toutes ces années passées à grandir ensemble. Cela fait quelques années que tu as fini tes études, tu devrais être contente : c'est mon tour !

A ma compagne et depuis quelques mois, ma femme,

A Mélanie,

Merci de m'avoir supporté pendant ces quelques mois intenses de rédaction de cette thèse. Merci pour ton aide, ton soutien, ton sourire, ton amour, et pour tout ce qui fait que je t'aime également.

Remerciements :	5
Glossaire :	12
Résumé :	13
Objectifs :	15
Partie I : Revue bibliographique.....	19
A) Rappels d'anatomie et de physiologie	19
1) La peau	19
2) Structure de la jonction dermo-épidermique.....	20
3) Les protéines de la jonction.....	23
B) La BP180.....	26
1) Structure protéique	26
2) Produits de clivage de la BP180.....	28
C) La pemphigoïde bulleuse	30
1) Définition, épidémiologie et généralités	30
2) Clinique	32
3) Diagnostic.....	34
4) Traitements	37
D) Physiopathologie de la pemphigoïde bulleuse	38
E) Rôle des IgE dans la pemphigoïde bulleuse et implication thérapeutique ...	44
F) Pemphigoïde bulleuse iatrogène	48
1) Immunothérapies anti-PD-1/L1	48
2) Gliptines (inhibiteurs de DPP4).....	49
Partie II : Matériels et méthodes	51
A) Patients	51
B) Détection des IgE déposées sur les biopsies de patients en immunofluorescence directe	51
C) ELISA IgE	51
D) Déplétion des IgG.....	51

E)	Culture cellulaire.....	52
F)	Traitement par la plasmine	53
G)	Obtention des extraits cellulaires et surnageant concentré	54
H)	PAGE-SDS.....	55
I)	Western blot.....	55
J)	Statistiques	55
	1) Normalisation des valeurs obtenues en milliDO :	55
	2) Détermination du seuil de positivité de l'ELISA :	56
	3) Tests statistiques :	56
Partie III : Résultats		57
A)	Mise au point d'une technique de Western blot : Détection des auto-anticorps ciblant des épitopes non détectables par les tests commerciaux	57
	1) Analyse des profils sur extraits de kératinocytes humains	57
	2) Obtention de surnageants enrichis LAD-1 et LABD97.....	60
	3) Comparaison des profils obtenus sur surnageant concentré avec le sérum de patients atteints de pemphigoïde bulleuse immuno-induite	66
	4) Comparaison des profils obtenus sur surnageant après traitement par la plasmine puis concentré avec le sérum de patients atteints de DIGAL	72
B)	Recherche des IgE dans la pemphigoïde bulleuse par IFD et mise au point d'une technique ELISA.....	76
	1) Détection de dépôts d'IgE sur biopsies congelées	76
	2) ELISA : Etude du phénomène de compétition des IgG et des IgE	77
	3) Comparaison des résultats obtenus avec et sans ajout d'EDTA	81
	4) Normalisation, détermination d'un seuil et validité de la méthode	87
	5) Résultat du dosage des IgE anti-NC16A par ELISA.....	90
	6) Comparaison des sous-groupes en fonction des paramètres biologiques ..	93
	a) Comparaison des taux d'IgE anti-NC16A et d'IgG anti-NC16A :	93
	b) Taux d'IgE totales	94

c) Taux de PNE circulants et présents le long de la jonction.....	95
7) Comparaison des sous-groupes en fonction des caractéristiques cliniques	97
a) Présence de bulles (N=86).....	97
b) Phénotype pauci- ou multi-bulleux (N=66)	97
c) Présence de prurit (N=86)	97
d) Intensification thérapeutique (N=86)	98
e) Sévérité de la maladie (N = 80).....	98
f) Autres paramètres cliniques (N = 86).....	99
8) Patients sous Omalizumab : Présence d'IgE anti-NC16A et efficacité thérapeutique	99
Partie IV : Discussion.....	105
Annexes.....	113
Bibliographie.....	145

Glossaire :

PB : pemphigoïde bulleuse

DBAI : dermatoses bulleuses auto-immunes

DIGAL : dermatose linéaire à IgA

Ig : immunoglobuline

IgG : immunoglobuline G

IgE : immunoglobuline E

IFI : immunofluorescence indirecte

IFD : immunofluorescence directe

PMM : pemphigoïde membranaire muqueuse

PG : pemphigoïde gestationnelle

LAD-1 : linear IgA disease

LABD97 : linear IgA bullous disease antigen 97kDa

JDE : jonction dermo-épidermique

PNN : polynucléaire neutrophile

PNE : polynucléaire éosinophile

BPAG1 : bullous pemphigoid antigen (= BP230)

BPAG2 : bullous pemphigoid antigen 2 (= BP180 = COL17A1)

AA : acides aminés

MMP : métallo-protéase matricielle

ADAM : a disintegrin and metalloprotease domain

PD-1 : programmed death 1

PD-L1 : programmed death ligand 1

Résumé :

La pemphigoïde bulleuse (PB) est une pathologie auto-immune médiée par les anticorps. La cible antigénique principale des auto-anticorps associés à la PB est une protéine de l'hémidesmosome, la BP180. Les techniques disponibles en routine détectent des auto-anticorps d'isotype IgG spécifiques d'une courte séquence de la BP180, le domaine NC16A. Bien que non recherchés en routine, des immunoglobulines d'isotype IgE anti-NC16A, et des IgG spécifiques d'autres épitopes, sont également présents chez certains patients atteints de PB. Nous avons développé un test ELISA pour détecter ces IgE spécifiques, et recherché l'existence de liens entre présence des IgE anti-NC16A, paramètres cliniques et biologiques et réponse thérapeutique à l'omalizumab. Nous avons également mis au point un Western blot permettant la détection d'auto-anticorps d'isotype IgG spécifiques de produits de clivage de la BP180 et recherché la présence de ces auto-anticorps chez des patients atteints de PB iatrogène.

Objectifs :

La pemphigoïde bulleuse (PB) est une maladie auto-immune acquise spécifique d'organe affectant la peau et les muqueuses. Bien que rare, c'est la plus fréquente des dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI). Le développement d'une réponse immunitaire dérégulée aboutissant à la production d'anticorps dirigés contre certaines protéines de la membrane basale dermo-épidermique (principalement la BP180 et la BP230) est à la base du développement de la maladie caractérisée par l'apparition de bulles de grande taille sur des plaques érythémateuses et prurigineuses. Alors que la maladie est généralement bien contrôlée par un traitement local à base de dermocorticoïdes, certaines formes graves requièrent des traitements immunosuppresseurs plus agressifs (1, 203).

Au laboratoire d'immunologie, l'immunofluorescence directe et indirecte permettent de révéler la présence d'auto-anticorps de classe IgG spécifiques des protéines de la jonction dermo-épidermique. Deux tests ELISA, commercialisés par Euroimmun® et MBL®, permettent la détection des IgG spécifiques d'un domaine particulier de la BP180 : le domaine NC16A. Les IgG anti-NC16A sont présentes dans plus de 90% des cas de PB, et leur taux est corrélé à l'activité de la maladie (2).

À côté du rôle pathogène bien démontré des autoanticorps de classe IgG, un faisceau d'arguments suggère l'implication des auto-anticorps de classe IgE dans la physiopathologie de la PB. Des IgE capables de reconnaître des éléments constitutifs de la jonction dermo-épidermique, et plus particulièrement des IgE spécifiques du domaine NC16A de la BP180, ont été mises en évidence par plusieurs techniques (IFD, IFI, ELISA, Western blot) (3–8). L'importance du rôle des IgE dans la physiopathologie de la PB est renforcée par l'implication des polynucléaires éosinophiles, leur présence le long de la jonction dermo-épidermique et leur capacité à pouvoir lier les IgE via les récepteurs au fragment Fcε (9,10). Aujourd'hui, il n'existe aucun test commercial permettant la détection des IgE anti-BP180 dans le sérum de patients. Par test ELISA, plusieurs auteurs ont mis en évidence des IgE dirigés contre la BP180 dans 50 à 80% des sérums de patients atteints de PB (6,11). Sur des biopsies de peau de patients analysées en immunofluorescence directe, la détection des IgE donne des résultats très variables selon les études (entre 10 et 20% sur la plus grande série étudiée, mais jusqu'à 60% sur de petites séries) (8,12). Parallèlement à ces découvertes, l'omalizumab (Xolair®), un anticorps monoclonal thérapeutique dirigé contre les IgE, est employé chez certains patients atteints de PB depuis une dizaine d'années. Plusieurs succès thérapeutiques ont été rapportés dans la littérature (13–15), mais en l'absence de test permettant le dosage des IgE anti-BP180, l'omalizumab est souvent prescrit devant la seule présence d'un taux sérique anormalement élevé d'IgE totales. Aucun biomarqueur n'a été rattaché à la prédiction de l'efficacité de ce traitement. La rémission n'est pas obtenue chez tous les patients traités. De plus, la compréhension du mécanisme d'action du Xolair® dans la pemphigoïde bulleuse reste à élucider. Les données de la littérature ne permettent actuellement pas de corréliser la présence de ces IgE anti-NC16A, les paramètres cliniques ou biologiques de la pathologie, et l'éventuelle efficacité de l'omalizumab.

Dans ce contexte, et devant l'augmentation des prescriptions d'omalizumab chez les patients atteints de PB réfractaires aux traitements conventionnels, le premier objectif de ce travail est d'évaluer les différents tests réalisables au laboratoire, de sélectionner, mettre au point et de valider un examen de routine pour la recherche des IgE spécifiques de la BP180 dans la PB. Nous avons recherché les IgE déposées le long de la jonction dermo-épidermique en immunofluorescence directe, sur la bio-banque de biopsies de peau constituée au laboratoire. Nous avons également mis au point notre propre test ELISA « maison » pour détecter les IgE anti-NC16A. Nous avons ensuite recherché si la présence ou l'absence d'IgE anti-NC16A circulantes pouvait être rattachée avec certaines présentations cliniques de la maladie ou sa sévérité, dans une cohorte de 87 patients atteints de PB. Enfin, grâce à ce test, nous avons évalué si la présence d'IgE anti-NC16A, en particulier à un taux élevé, pouvait être prédictive d'une réponse thérapeutique au traitement par omalizumab. Cette cohorte comprend une douzaine de patients traités par omalizumab au CHU de Toulouse au cours de ces dernières années.

Près de 90% des patients atteints de PB développent des auto-anticorps contre le domaine NC16A de la BP180 (16). Environ la moitié des patients NC16A négatifs possèdent des IgG anti-BP230 (17). La combinaison des deux tests ELISA confère donc une sensibilité d'environ 95% pour le diagnostic de PB (18). Il reste donc environ 5% de patients pour lesquels les tests ELISA commerciaux ne détectent aucune positivité, malgré une clinique évocatrice et la positivité des autres analyses (IFI, IFD, anatomopathologie) (19).

Bien entendu, en dehors du peptide NC16A, la réponse humorale prend pour cible bien d'autres épitopes de la protéine BP180 comme l'on révélé plusieurs études (19,20). La BP180 (également appelée BPAG2 ou collagène XVII) est une protéine de grande taille (1497 acides aminés), constituée d'un domaine intracellulaire N-terminal, d'une partie transmembranaire, et d'un ectodomaine, qui contient le domaine NC16A (Fig 5). Le clivage de la BP180 par la plasmine au niveau de ce domaine NC16A libère un fragment dénommé LAD-1, de poids moléculaire apparent de 120kDa. La digestion complète par la plasmine clive en plus la partie C-terminale de la BP180, et permet la libération d'un autre fragment, LABD97, de poids moléculaire apparent de 97kDa (Fig 6) (21,22). Plusieurs auteurs ont retrouvé dans le sérum de patients atteints de PB des anticorps (essentiellement d'isotype IgG) dirigés contre l'ectodomaine de la BP180 (20,23). L'étude du sérum de patients atteints de PB, mais « anti-NC16A et anti-BP230 séronégatifs » (i.e. tests ELISA anti-NC16A et anti-BP230 négatifs) a montré la présence d'auto-anticorps anti-LAD-1 dans 70% des cas (19).

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté le développement de PB iatrogènes, associées aux traitements du diabète par les inhibiteurs de DPP4 (gliptines) (revue : (24), et surtout au décours de traitements par anti-PD-1 ou anti-PD-L1, deux inhibiteurs de checkpoints du système immunitaire, utilisés en oncologie (revue : (25). Ces études semblent indiquer que le profil de réactivité anti-BP180 chez ces patients est différent de celui des PB « classiques », avec une proportion plus importante de PB NC16A séronégatives (23,25). Actuellement, il n'existe pas de test commercial permettant la

détection de ces auto-anticorps spécifiques des produits de clivage de la BP180. Dans le but de mettre en évidence ces auto-anticorps, nous avons développé une technique d'immunoblot basée sur des lysats de kératinocytes humains en culture ou de leur surnageant. Nous avons ensuite recherché la présence d'auto-anticorps spécifiques des domaines de clivage de la BP180 chez des patients ayant développé un tableau clinique de PB au décours d'un traitement par anti-PD-1 ou anti-PD-L1. Cette technique permettrait de compléter la démarche diagnostique de PB chez des patients NC16A séronégatifs, surtout dans ces contextes particuliers (traitement par gliptines, anti-PD-1 ou anti-PD-L1), afin d'adapter rapidement le traitement de ces patients, et d'étudier le lien entre l'usage des anti-PD-1 sur l'apparition de tels auto-anticorps. Par ailleurs, la technique développée permettra de mettre en évidence des auto-anticorps dirigés contre d'autres cibles rares retrouvées dans certaines dermatoses bulleuses auto-immunes. L'identification de telles cibles est effectuée dans un nombre restreint de laboratoires en France, le développement de cette technique permettra donc de réduire le délai diagnostique pour certaines dermatoses auto-immunes rares diagnostiquées au CHU de Toulouse.

En résumé, ce travail de thèse a poursuivi plusieurs objectifs : (1) la mise au point de techniques permettant de rechercher de nouveaux auto-anticorps et ainsi d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de PB, (2) l'analyse des résultats obtenus grâce à ces techniques et la recherche d'un lien éventuel avec certaines caractéristiques cliniques ou biologiques, (3) l'implantation de ces techniques au laboratoire d'auto-immunité du CHU de Toulouse. Ce travail a permis d'évaluer l'intérêt de la recherche de ces auto-anticorps non recherchés en routine, dans le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de PB.

Partie I : Revue bibliographique

A) Rappels d'anatomie et de physiologie

1) La peau

La peau est la première barrière de protection de l'organisme, et elle est indispensable au maintien de l'intégrité de tout organisme vivant. C'est un organe à part entière, qui sépare l'organisme vivant du milieu extérieur et qui a diverses fonctions physiologiques, que nous ne détaillerons pas ici (26). La peau est constituée de trois couches superposées, de la plus profonde à la plus superficielle : l'hypoderme, le derme, et l'épiderme (Fig 1).

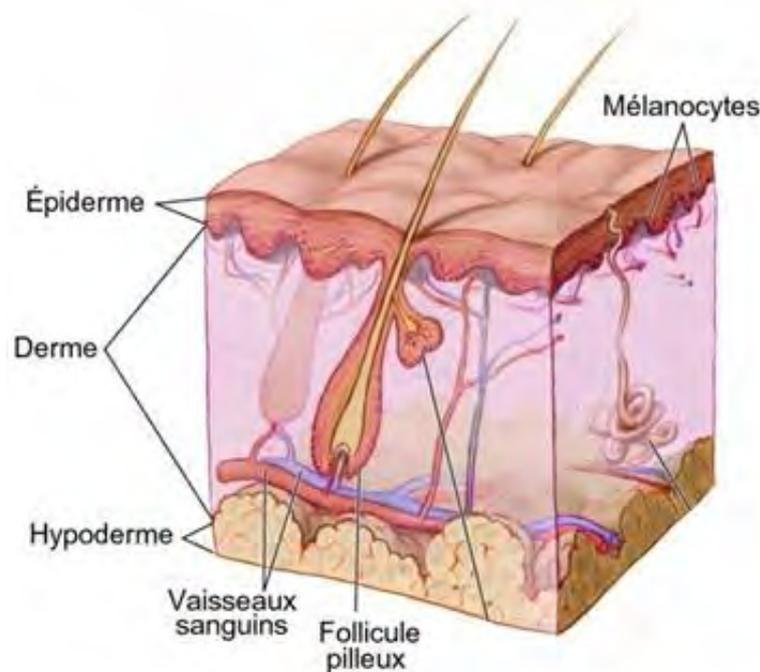


Figure 1 : Représentation schématique des trois couches composant la peau (27) De haut en bas, on trouve l'épiderme, séparé du derme par la membrane basale. Le derme, au milieu, est vascularisé et contient la base des follicules pileux.

Les deux couches inférieures sont des tissus conjonctifs, alors que la plus superficielle, l'épiderme, est un épithélium de revêtement stratifié et cornifié. L'épiderme est essentiellement constitué par les kératinocytes, qui assurent la fonction de barrière de la peau. Il contient également des mélanocytes, qui confèrent à la peau sa pigmentation. Il est séparé du derme par la membrane basale, également appelée jonction dermo-épidermique (JDE). A partir de cette membrane basale, les kératinocytes prolifèrent et se différencient (Fig 2).

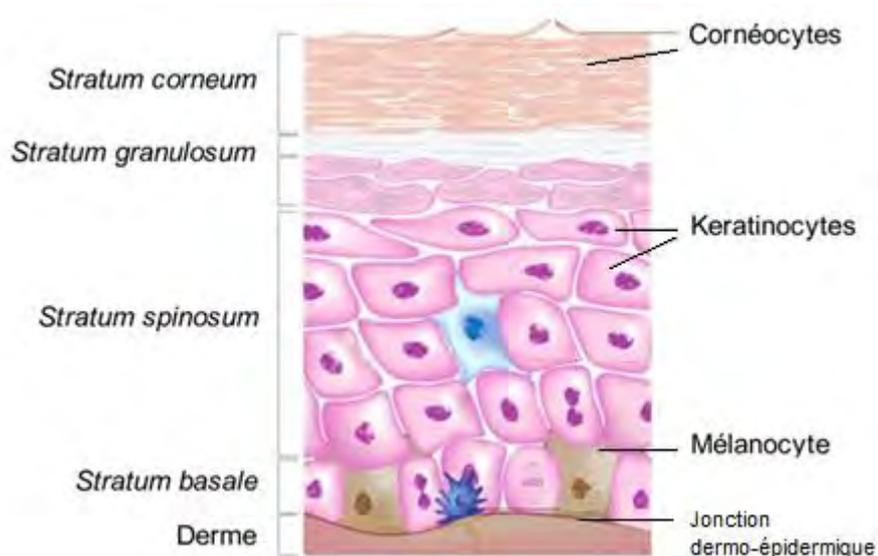


Figure 2 : Les couches successives des kératinocytes constituent l'épiderme. On trouve de bas en haut la membrane basale (ou JDE pour jonction dermo-épidermique), puis la couche basale de kératinocytes. Au fur et à mesure les kératinocytes se différencient, changent de morphologie, dans la couche épineuse puis la couche granuleuse. Enfin, les kératinocytes achèvent le processus de cornification et constituent la couche cornée. (28)

La couche basale est constituée d'une seule couche de kératinocytes ancrés au niveau de la JDE. Ces kératinocytes prolifèrent et renouvellent continuellement l'épiderme (28). Les kératinocytes situés dans la couche épineuse se différencient et deviennent cohésifs. On trouve ensuite la couche granuleuse, qui contient les derniers kératinocytes vivants avant la cornification. La couche cornée est la plus superficielle de l'épiderme, elle est imperméable et constituée de cellules mortes, les cornéocytes, le dernier stade de différenciation des kératinocytes (29). L'ancrage des kératinocytes au niveau de la membrane basale est assuré par une structure appelée hémidesmosome (détaillé dans le chapitre A2). Les kératinocytes qui constituent les couches suivantes sont maintenus en cohésion par des structures appelées desmosomes.

2) Structure de la jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique constitue la frontière entre l'épiderme et le derme, et interagit donc avec plusieurs constituants de ces deux tissus. La JDE est formée par l'hémidesmosome, une structure intracellulaire et transmembranaire, et la lamina basale, sur laquelle reposent les kératinocytes. L'hémidesmosome est une structure complexe et composée de nombreuses protéines. Son rôle est de relier le cytosquelette du kératinocyte basal à la membrane basale dermo-épidermique. L'hémidesmosome est également une structure dynamique : le kératinocyte doit pouvoir rompre son adhésion à la membrane basale, pour proliférer et générer les kératinocytes qui constituent la couche épineuse. Il doit aussi pouvoir migrer en cas

d'agression de la barrière cutanée, pour rétablir l'intégrité de la peau. Cette physiologie du kératinocyte est décrite dans plusieurs revues (17,30,31).

L'hémidesmosome est intimement lié à la membrane basale par de nombreuses protéines intra et extracellulaires. La membrane basale a la particularité d'être constituée par des protéines sécrétées à la fois par les kératinocytes basaux de l'épiderme, et par les fibroblastes du derme sous-jacent.

Les filaments intermédiaires constituant le cytosquelette du kératinocyte sont reliés à la plaque interne de l'hémidesmosome, dans le cytosol du kératinocyte. Des protéines transmembranaires réalisent le lien entre la plaque interne de l'hémidesmosome et la membrane basale, cette dernière étant située sous la membrane plasmique du kératinocyte. La membrane basale est constituée de la lamina lucida et de la lamina densa, elles-mêmes traversées par des filaments ancrant la membrane basale dans le derme sous-jacent. La structure de la jonction dermo-épidermique est détaillée dans la figure 3.

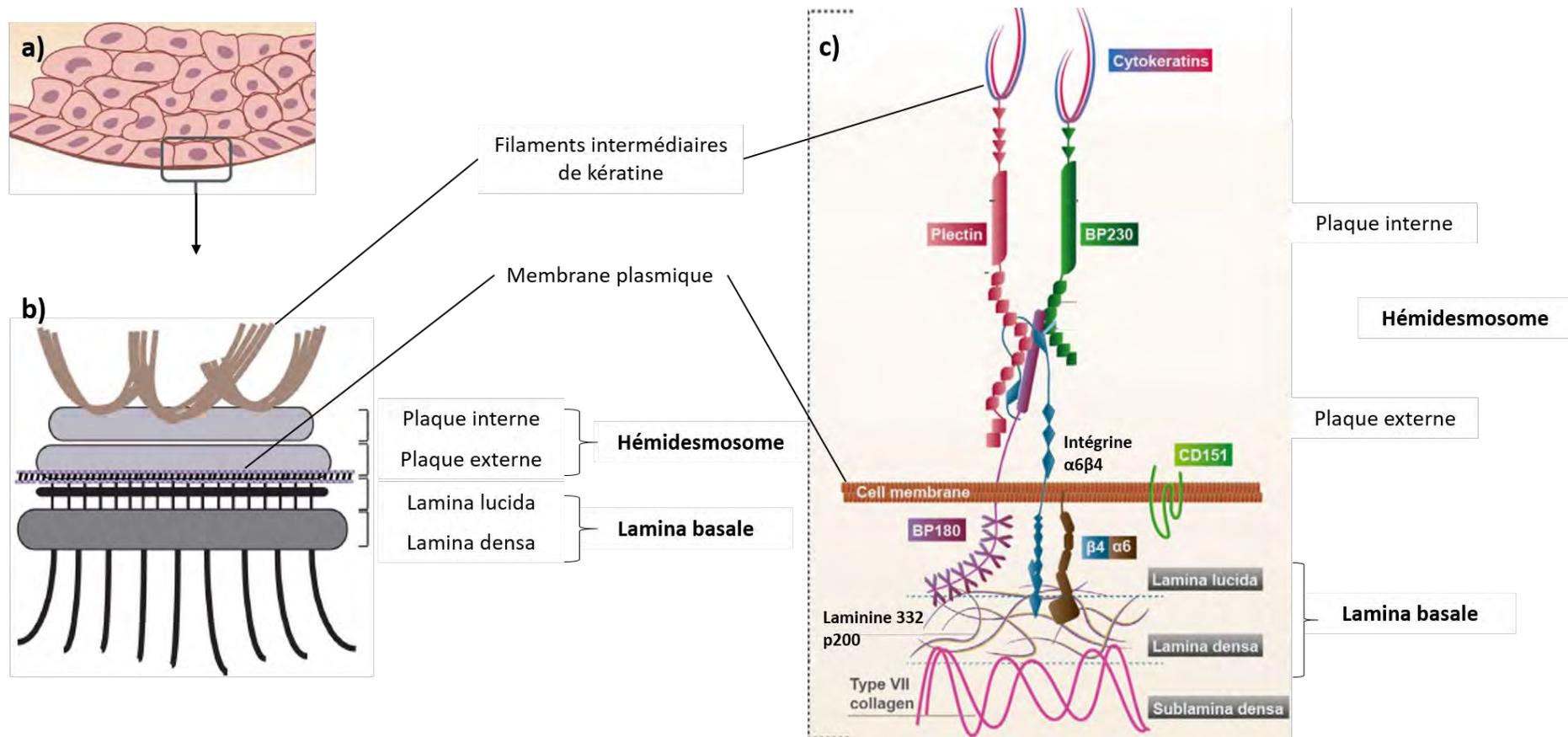


Figure 3 : Structure et composition de la jonction dermo-épidermique. a) L'épiderme repose sur la membrane basale ou jonction dermo-épidermique. b) Les plaques interne et externe de l'hémidesmosome sont situées dans le kératinocyte, en contact étroit avec les filaments intermédiaires de kératine et la membrane plasmique. L'hémidesmosome repose sur la lamina lucida puis la lamina densa. c) Les protéines qui composent cette structure sont nombreuses et interagissent entre elles. On retrouve tous les acteurs du maintien de la cohésion entre derme et épiderme, avec de haut en bas le cytosquelette du kératinocyte, puis la plectine et la BP230 qui constituent la plaque interne. Des protéines transmembranaires, l'intégrine $\alpha6\beta4$ et la BP180, constituent la plaque externe. On trouve ensuite la laminine 332 ou laminine 5 et la protéine p200 qui constituent la lamina lucida et la lamina densa, et enfin le collagène de type VII. Modifié, à partir de (17,24,31).

3) Les protéines de la jonction

L'étude des dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) implique la connaissance des protéines impliquées dans cette structure macromoléculaire qu'est le binôme « hémidesmosome – membrane basale ». La plupart des protéines de cette structure peut être reconnue par des auto-anticorps circulants. Elles peuvent également être concernées par des déficits constitutifs, responsables de plusieurs pathologies. Ces déficits et ces maladies auto-immune ont pour points communs la protéine concernée, et l'apparition de bulles cutanées. La majorité de ces protéines est située dans l'espace extracellulaire, mais une partie d'entre elles est intracellulaire. Les conséquences de la dysfonction de ces protéines (par anomalie structurelle génétique, ou suite à l'inflammation qui découle du dépôt des auto-anticorps) sont la fragilisation de la JDE et le décollement de l'épiderme. Une bulle se forme entre le derme et l'épiderme, et peut être le siège du recrutement de cellules pro-inflammatoires. Les symptômes qui en découlent sont dus à ce décollement de la jonction, et aux médiateurs inflammatoires libérés localement.

Des mutations des gènes codant les nombreuses protéines impliquées dans cette structure macromoléculaire qu'est la jonction dermo-épidermique provoquent des pathologies de la jonction, regroupées sous le terme d'épidermolyse bulleuse (Table 1). Suivant la protéine impliquée, on décrit trois types d'épidermolyse bulleuse : (31)

- EBS (épidermolyse bulleuse simple)
- JEB (épidermolyse bulleuse jonctionnelle)
- DEB (épidermolyse bulleuse dystrophique)

Structure concernée et maladie génétique	Gène (protéine) impliquée	DBAI correspondante
Lamina lucida : JEB	ITGA6 (Intégrine α 6)	PMM
Lamina lucida : JEB	ITGB4 (Intégrine β 4)	PMM
Lamina lucida : JEB	BPAG2 (BP180)	PB, PG, PMM
Lamina lucida : JEB	LAMA3, LAMB3, LAMC2 (Laminine 332 ou Laminine 5)	PMM
Lamina densa : DEB	Collagène VII	EBA
Hélicesmosome : EBS	Kératine K5/K14, Plectine, BPAG1	PB, PG

Tableau 1 : Les maladies constitutionnelles, le gène et la protéine impliqués et la DBAI correspondante lors du développement d'auto-anticorps. EBA : épidermolyse bulleuse acquise, EBS : epidermolysis bullosa simplex, JEB : jonctionnal epidermolysis bullosa, DEB : dystrophic epidermolysis bullosa. PB : pemphigoïde bulleuse, PG : pemphigoïde gestationnelle, PMM : pemphigoïde membraneuse muqueuse. A partir de (31).

La plupart de ces protéines peuvent donc être reconnues par des auto-anticorps, qui sont recherchés afin de poser le diagnostic de DBAI (1,32). Ces protéines, leur agencement et leurs interactions sont décrites dans une revue générale (31). Dans la figure 4 sont représentées les protéines de l'hémidesmosome, donc font partie la BP180 et la BP230, les cibles des auto-anticorps dans la PB.

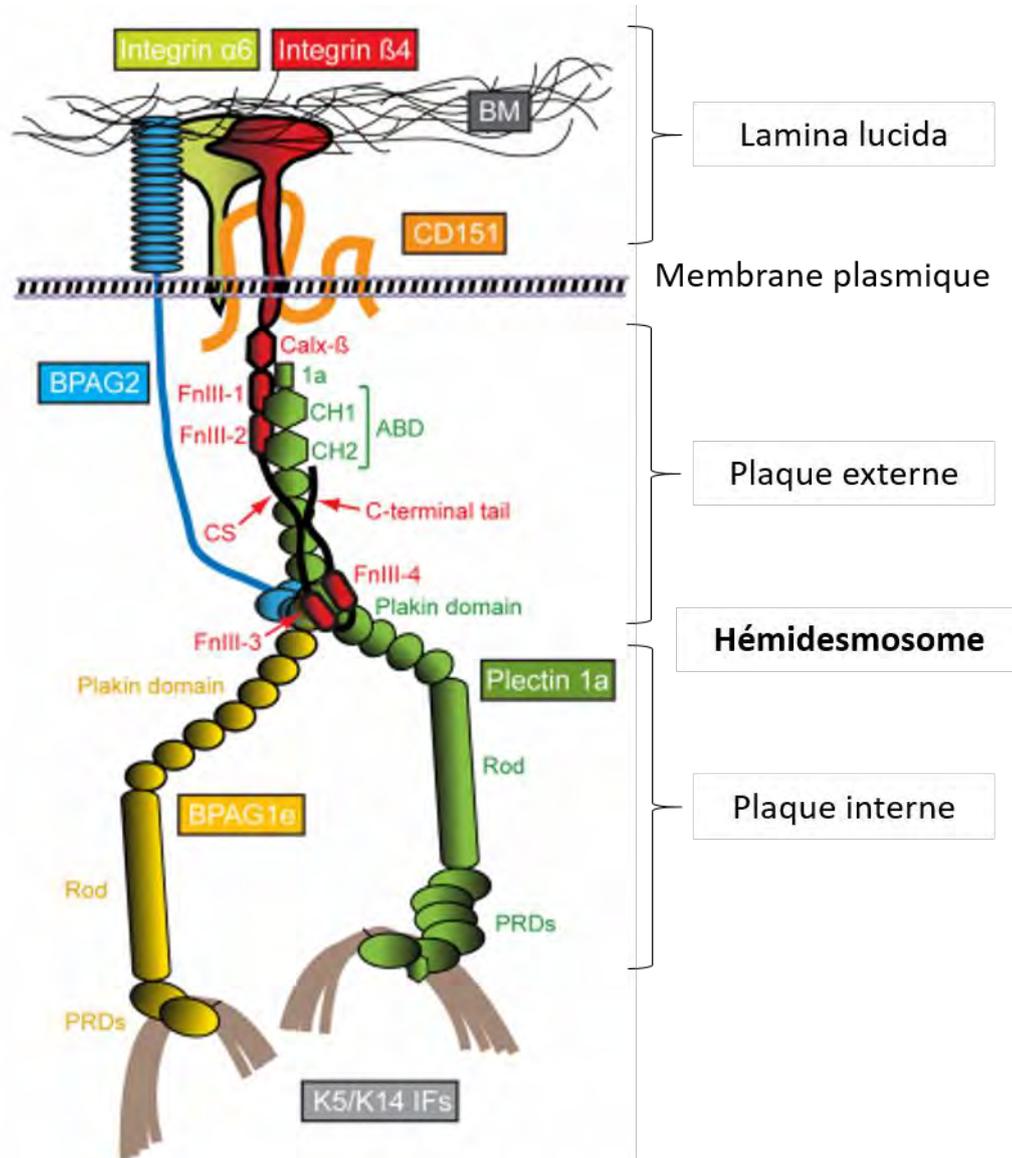


Figure 4 : L'hémidesmosome et les interactions moléculaires entre les acteurs de la jonction dermo-épidermique. Les protéines de la JDE interagissent entre elles selon un réseau garantissant la cohésion du cytosquelette du kératinocyte à la membrane basale (31).

Les filaments intermédiaires de kératine (IFs K5/K14) sont situés dans le cytosol du kératinocyte. Ils constituent le ligand intracellulaire de l'hémidesmosome. La plectine (P1a) est également située au niveau intracellulaire, et interagit avec les filaments intermédiaires. Ces deux protéines relient ensuite l'hémidesmosome à l'intégralité de la structure interne du kératinocyte (membranes nucléaire et mitochondriale, cytosquelette, jonctions intercellulaires). On ne retrouve pas d'anticorps les ciblant

dans les DBAI. Ces deux protéines interagissent avec la BPAG1 (ou BP230). Cette protéine de 230kDa a été découverte en tant que cible dans la pemphigoïde bulleuse (33,34). Bien qu'intracellulaire, cette protéine est ciblée par des auto-anticorps. La nature, les isotopes et le caractère pathogène de ces anticorps anti-BP230 sont discutés dans plusieurs revues (17,35). La BP230 et la plectine constituent la plaque interne de l'hémidesmosome, et sont toutes deux reliées à une protéine de 180kDa : la BP180.

L'antigène majeur dans la pemphigoïde bulleuse est la BPAG2 (ou BP180), une protéine de 180kDa. Sa structure est détaillée dans le paragraphe B. La BP180 interagit avec la BP230 et la plectine au niveau intracellulaire. Elle possède un domaine transmembranaire, et une longue queue extracellulaire, qui interagit avec les constituants de la lamina lucida et de la lamina densa.

Le complexe intégrine $\alpha 6\beta 4$ est transmembranaire, comme la BP180. L'intégrine $\beta 4$ interagit avec la BP180 et la plectine au niveau intracellulaire. Au niveau extracellulaire, elle interagit avec des intermédiaires de signalisation impliqués dans la prolifération et la survie du kératinocyte. Elle se complexe également avec l'intégrine $\alpha 6$, au sein de la lamina lucida. L'intégrine $\alpha 6$ interagit également avec la BP180, le CD151 et la laminine 332 au niveau de la lamina lucida. La BP180, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et le CD151 constituent la plaque externe de l'hémidesmosome. Le CD151 est une tétraspanine, une protéine à 4 domaines transmembranaires. Il s'associe aux hémidesmosomes et participe à sa formation et son renouvellement. *In vitro*, son absence stabilise l'hémidesmosome et empêche la migration des kératinocytes. On ne retrouve pas d'anticorps anti-CD151 dans les DBAI.

Au niveau de la membrane basale on trouve la laminine 5 (ou laminine 332 pour $\alpha 3\beta 3\gamma 2$), sécrétée par les kératinocytes, et constituant de la lamina densa. Elle interagit avec la BP180 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. Notons que dans une pemphigoïde particulière, la pemphigoïde cicatricielle (également appelée membraneuse muqueuse) on peut retrouver des auto-anticorps dirigés contre la BP180, la BP230, mais également la laminine 5 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (36). Enfin, on trouve le collagène VII, synthétisé par les fibroblastes dermiques, qui constitue la sublamina densa. Ce collagène VII est la cible d'auto-anticorps dans l'épidermolyse bulleuse acquise (37). On y trouve également la laminine gamma 1 (ou p200), une cible d'auto-anticorps dans une forme de pemphigoïde appelée pemphigoïde à p200 (38–40).

Au centre de toutes ces interactions, se trouve donc la BP180. Pour assurer sa principale fonction, garantir l'intégrité de la jonction dermo-épidermique et l'adhésion des kératinocytes à la membrane basale, elle interagit avec un grand nombre de partenaires moléculaires, à la fois intracellulaires, extracellulaires ou transmembranaires. Les sites précis de ces interactions restent encore aujourd'hui sujets à interprétation (41,42). Tous les articles relatant la découverte de ces interactions, dans les années 1990, sont révisés dans (42).

B) La BP180

La BP180 est principalement exprimée dans les épithéliums, par les kératinocytes. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II : l'extrémité N-terminale est intracellulaire, et la C-terminale est extracellulaire. Les deux extrémités de la BP180 interagissent avec les autres protéines de la jonction dermo-épidermique. Elle est exprimée à la membrane plasmique des kératinocytes sous la forme d'un homotrimère, enroulé en triple hélice. Au niveau intracellulaire, elle est reliée au cytosquelette du kératinocyte. Sa partie extracellulaire a une structure « collagène-like » et elle est reliée aux protéines de la lamina lucida et de la lamina densa. Elle participe à l'adhésion des kératinocytes basaux avec la membrane basale, et donc à la cohésion indispensable entre le derme et l'épiderme. Les auto-anticorps dirigés contre la BP180 sont au cœur de la physiopathologie de la pemphigoïde bulleuse (43).

1) Structure protéique

La BP180 tient sa dénomination de son implication dans la PB (Bullous Pemphigoid) et de sa migration à un poids moléculaire apparent de 180kDa (44). La BP180 est également appelée BPAG2 (pour Bullous Pemphigoid Antigen 2), ou COL17A1 en référence à la structure collagénique de son domaine extracellulaire. Il s'agit d'une protéine de grande taille : 1497 acides aminés (AA). La séquence et le découpage de ces différents domaines sont détaillés en annexe (Annexe 1). Elle est codée par le gène COL17A1, situé sur le chromosome 10 (sur le bras long, entre q24.3 et q25.1) (45). Son expression tissulaire est majoritairement retrouvée dans les épithéliums : la peau, les muqueuses génitales et l'œsophage (46).

On peut diviser la BP180 en trois parties (Fig 5) : (1) le domaine NC16C, intracellulaire (AA 1 – 467) (2) le domaine NC16B, transmembranaire (AA 468 – 488) et (3) la queue extracellulaire (AA 489 – 1497). Cette partie extracellulaire, ou ectodomaine, est la plus importante (plus de 1000 AA) et est composée du domaine NC16A, accolé à la membrane plasmique, puis une alternance de domaines collagéniques (C15 à C1) et non collagéniques (NC15 à NC1).

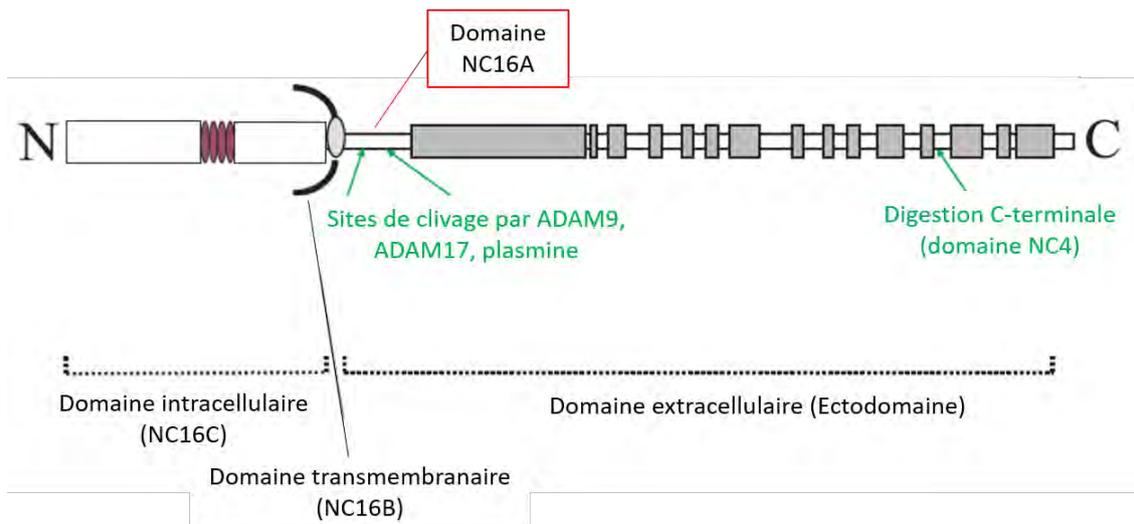


Figure 5 : Schéma de la BP180 et des sites d'intérêt. Le domaine intracellulaire (NC16C) et le domaine transmembranaire (NC16B) sont situés à l'extrémité N-terminale. On trouve ensuite le domaine NC16A, qui contient les sites de clivage par différentes protéases. L'ectodomaine (partie extracellulaire) est ensuite constituée d'une succession de domaines collagéniques (en gris) et non collagéniques (en blanc). Le domaine non collagénique NC4 contient également un site de digestion enzymatique. A partir de (11).

Le domaine NC16A (AA 489 à 566) est la cible majoritaire des auto-anticorps dans la PB. Bien que très court, il contient un grand nombre de motifs déterminants pour la structure, la conformation et les fonctions de la BP180 (sites de clivage enzymatique, séquences assurant un repliement correct, etc). La séquence protéique de ce domaine est soumise à une extrême variabilité inter-espèces (47), ce qui est paradoxal au vu de son importance capitale dans la conformation et les fonctions physiologiques de la BP180. Cette variabilité a été analysée chez 100 espèces mammifères et est présentée en annexe (Annexe 2). Certains motifs présents à l'intérieur du domaine NC16A semblent effectivement indispensables à la conformation et à la physiologie de la BP180, et par conséquent à la formation correcte de l'hémidesmosome. La formation de la membrane basale nécessite effectivement un « shedding » correct de la BP180 (48). L'enroulement de la triple hélice est favorisé par la présence de séquences « coiled-coil », hautement conservées dans l'évolution (49). Une fois sa conformation acquise, celle-ci est maintenue par des liaisons hydrophobes entre les nombreux domaines collagéniques du domaine extracellulaire. Les domaines collagéniques C1 à C15 sont en effet constitués de motifs collagéniques répétés (Gly – X – Y). Le repliement correct de la BP180 nécessite, au même titre que les protéines collagéniques, la présence d'acide ascorbique dans le milieu (50).

La séquence « furine » (RRIR) n'est retrouvée que chez l'Homme, et elle n'est pas indispensable à la libération de l'ectodomaine (41). Il semble que TACE (=ADAM17) soit responsable d'environ 50% du clivage de l'ectodomaine de la BP180. Dans cet article, les auteurs montrent que la séquence indispensable au clivage de l'ectodomaine correspond aux AA 528 à 547. Une autre étude indique que la localisation de la BP180 dans les rafts lipidiques est importante pour la libération de l'ectodomaine et que le site de clivage se situerait entre la Gly 539 et la Leu 540 (51). L'importance de TACE (ADAM17) est d'autant plus probable que cette enzyme a une

forme membranaire, et peut donc cliver le domaine NC16A situé à proximité de la membrane. Quelques sites de phosphorylation sont présents sur le domaine NC16A. Ils semblent réguler, via la caséine kinase, la libération de l'ectodomaine, en s'opposant par encombrement stérique à l'action de TACE lorsque les Ser 542 et 544 sont phosphorylées (51).

La BP180 ne contient qu'un seul site de N-glycosylation : l'Asn 1421, située sur le domaine NC2. Cette glycosylation semble primordiale pour une expression correcte de la BP180 à la membrane : en effet une forme d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (JEB) est provoquée par l'apparition précoce d'un codon STOP. L'Asn 1421 se retrouve alors trop près de l'AA C-terminal, ce qui s'oppose à une glycosylation efficace. La BP180 se retrouve séquestrée dans le cytosol, et seulement 15% est exprimé à la membrane (52).

Le clivage physiologique de l'ectodomaine, et donc la libération de LAD-1 d'une part, et le décrochage du kératinocyte de la membrane basale d'autre part, aurait lieu au niveau de la Leu 524 ou de la Gln 525 (53). La détermination de l'AA N-terminal de l'ectodomaine dépend du fragment formé, et évidemment de l'enzyme employée : Ala 531 pour LABD97 (54) et Leu 524 ou Ala 528 pour LAD-1 généré par la trypsine (22). L'Ala 531 n'est pas un site de clivage reconnu ; en revanche les sites de clivage générant LAD-1 sont très conservés, et peuvent être clivés par plusieurs protéases (ADAM ou MMP9). L'analyse de la conservation des sites de clivage chez l'Homme et six autres espèces mammifères permet en effet d'affirmer qu'en dépit d'une variabilité importante du domaine NC16A entre les espèces, on retrouve une densité importante de site de clivages au niveau du domaine NC16A (Annexe 3, analyse réalisée avec le logiciel en ligne Prosper) (55).

2) Produits de clivage de la BP180

Le clivage de protéines transmembranaires de type I ou de type II (domaine extracellulaire N-terminal ou C-terminal) fait partie intégrante de la physiologie de ces protéines. Le clivage de la BP180 est donc finement régulé. Plusieurs enzymes, dont les métalloprotéinases (ADAMs), la plasmine, l'élastase neutrophile, clivent la BP180 au niveau de son domaine NC16A, et libèrent ainsi l'ectodomaine (56–58). Ce phénomène est nécessaire à la migration des kératinocytes, la cicatrisation de la peau et la formation de la membrane basale (30,48).

Lorsque la BP180 n'est clivée qu'au niveau N-terminal, le fragment libéré (LAD-1) reste relié à la lamina lucida par son côté C-terminal (Fig 6). En PAGE-SDS en conditions dénaturantes, ce fragment migre à un poids moléculaire de 120kDa (Fig 7). Lorsque la BP180 est clivée à la fois au niveau N-terminal (près de la membrane plasmique du kératinocyte) et C-terminal (au sein de la lamina densa), le fragment libéré est appelé LABD97 (Fig 6) (pour « Linear IgA Bullous Disease ») et migre à un poids moléculaire de 97kDa (Fig 7). Ces fragments sont la cible antigénique d'auto-anticorps d'isotype

IgA retrouvés dans le cadre d'une dermatose bulleuse auto-immune rare, la dermatose linéaire à IgA (DIGAL) (59).

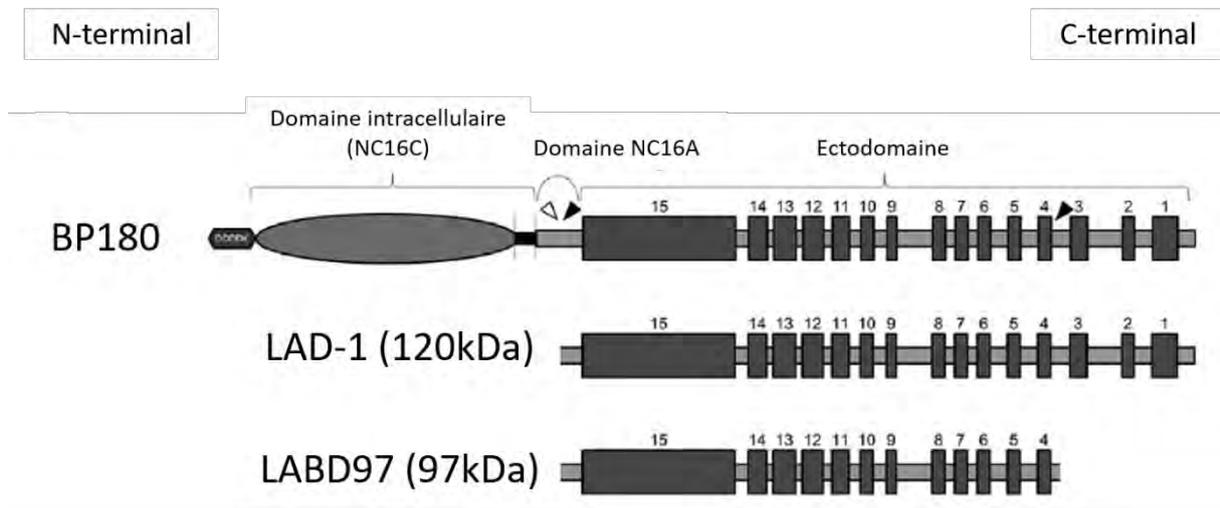


Figure 6 : La BP180 et ses produits de clivage. On retrouve la structure de la BP180. Le fragment LAD-1 est constitué de la quasi-totalité de la partie extracellulaire (ou ectodomaine), après clivage au sein du domaine NC16A sur les sites indiqués par les triangles blanc et noir. Le domaine NC4 contient également un site de clivage, impliqué dans la génération du fragment LABD97. D'après (60).

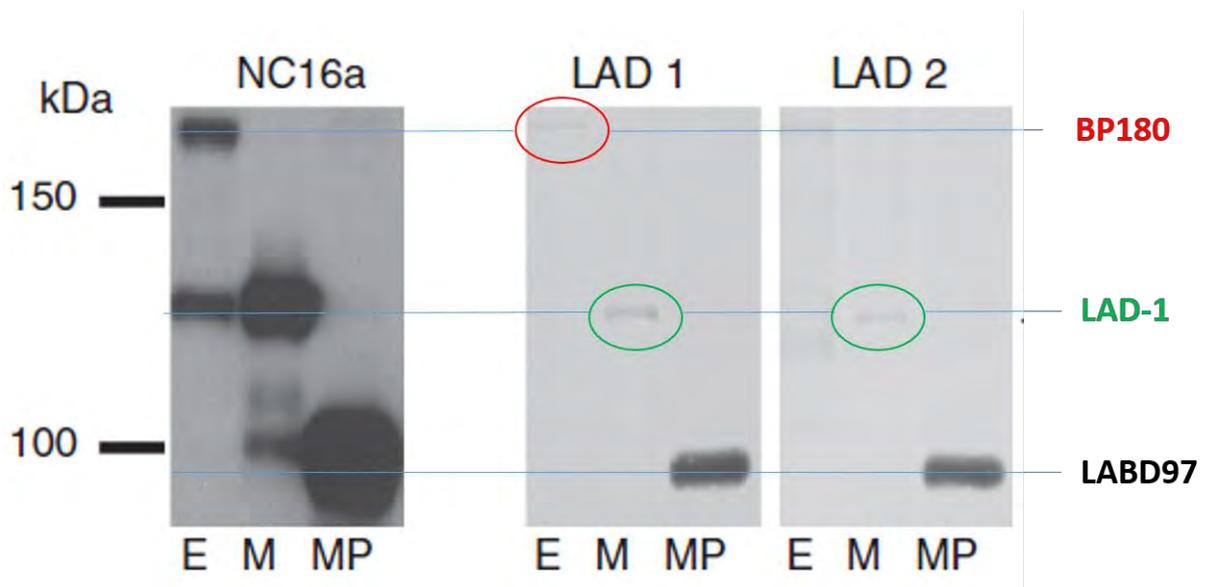


Figure 7 : Le milieu de culture des kératinocytes contient les fragments de digestion de 120kDa et de 97kDa. Les extraits de kératinocytes (E) contiennent la BP180 (en rouge). Le milieu de culture (M) contient le fragment LAD-1 (en vert). Après traitement par la plasmine (MP), le milieu contient le fragment LABD97. A gauche, après révélation par un anticorps monoclonal. A droite, après révélation par le sérum de deux patients atteints de DIGAL (LAD 1 et LAD 2). A partir de (21).

Plusieurs études ont montré que la digestion enzymatique de la BP180 en LAD-1 génère des modifications conformationnelles de l'ectodomaine, permettant la reconnaissance de LAD-1 par des auto-anticorps qui ne reconnaissaient pas la BP180

sous sa forme native (11,50,60). Ces néo-épitopes seraient situés sur le domaine NC16A ou à la limite entre les domaines NC16A et C15 (61). Ils pourraient également être situés sur le domaine C15, qui aurait partiellement perdu sa conformation de triple hélice à la suite du clivage du domaine NC16A (11). L'origine épithéliale du fragment de 120kDa, LAD-1, synthétisé et relargué dans le milieu de culture de kératinocytes, fut découverte en 1996 par Marinkovich et ses collaborateurs (62). Un anticorps monoclonal capable de reconnaître ce fragment se fixe le long de la JDE et induit la séparation du derme et de l'épiderme *ex vivo* sur de la peau humaine. Des auto-anticorps capables de reconnaître ce fragment de clivage de la BP180 peuvent être retrouvés chez certains patients atteints de pemphigoïde bulleuse (19,23). Les fragments LABD97 et LAD-1 sont également la cible d'auto-anticorps dans la pemphigoïde membranaire muqueuse (PMM) (63,64).

La reconnaissance par les IgA de patients atteints de dermatose linéaire à IgA d'un fragment migrant à 97kDa a été décrite au début des années 1990 (65). Plusieurs auteurs ont ensuite retrouvé, chez des patients atteints de DIGAL et de PB, des anticorps capables de reconnaître ce fragment de 97kDa (59). En 1999, la comparaison de la séquence en acides aminés des fragments LABD97 et LAD-1 permit à Zone et ses collaborateurs (54) de suggérer que LABD97 et LAD-1 proviennent tous deux de la BP180. Les enzymes responsables de ce clivage sont probablement différentes, car les fragments LABD97 et LAD-1 ont des acides aminés N-terminaux différents (22).

La distinction entre LABD97 et LAD-1 reste importante, bien que les deux produits de clivage proviennent de la même protéine, et que leur taille ne soit pas très éloignée : certains auto-anticorps reconnaissent seulement LAD-1. Plusieurs études ont en effet montré que le sérum de patients atteints de PMM reconnaît la partie C-terminale de LAD-1 (66,67), partie qui est justement absente de LABD97. Les patients atteints de dermatose linéaire à IgA reconnaissent des épitopes présents sur le fragment LABD97, qui sont également présent sur le fragment LAD-1. Le domaine NC4 contiendrait le site de clivage de LAD-1 en LABD97. La plasmine serait l'enzyme responsable de ce clivage, au niveau de l'AA R1303 (68).

C) La pemphigoïde bulleuse

1) Définition, épidémiologie et généralités

La pemphigoïde bulleuse est une maladie auto-immune spécifique d'organe. Les tissus atteints sont la peau et les muqueuses. Sa prévalence est rare dans la population générale, mais plus élevée si l'on considère les sujets de plus de 65 ans. Le diagnostic de la pemphigoïde bulleuse est à la fois clinique, anatomopathologique et biologique (cf partie C3). Selon l'encyclopédie Orphanet, la PB est « une maladie auto-immune dermatologique caractérisée par l'apparition de bulles de grande taille sur des plaques érythémateuses et prurigineuses, qui précèdent souvent l'apparition

de la maladie. Les lésions sont situées principalement sur les membres. Il s'agit d'une maladie potentiellement grave, qui nécessite habituellement un traitement de longue durée. » (202). D'un point de vue clinique, on retrouve classiquement une triade : base érythémateuse, prurit, bulles cutanées. D'un point de vue immunologique, elle est caractérisée par l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre deux macromolécules de l'hémidesmosome : la BP180 (ou BPAG2) et la BP230 (ou BPAG1). Le rôle pathogène de ces auto-anticorps est largement décrit dans la physiopathologie de la maladie, et fait de la PB une maladie auto-immune médiée par les anticorps (69,70).

Le meilleur argument pour affirmer l'implication des auto-anticorps dans le déterminisme des lésions est le développement de la maladie après transfert passif des auto-anticorps supposés pathogènes dans un organisme sain. Comme nous le verrons dans la partie C4, cette stratégie n'est applicable *in vivo* chez la souris qu'à moins de quelque subtilité. Cependant, une maladie rare proche de la PB : la pemphigoïde gestationnelle (PG) permet de répondre à la question de la transmissibilité de la maladie par voie transplacentaire. La pemphigoïde gestationnelle est une maladie proche de la PB, avec pour singularités l'âge des patientes et le déclenchement pendant la grossesse (71). La PG se caractérise par la présence de la BP180 au niveau placentaire, et le développement d'auto-anticorps d'isotype IgG anti-BP180, responsables de rares cas de transmission materno-fœtale de la maladie avec le développement de lésions bulleuses chez l'enfant (72,73). Après la disparition des anticorps pathogènes d'origine maternelle, les bulles ont rapidement disparu chez le nouveau-né. Ces données permettent de confirmer la responsabilité des auto-anticorps dans le développement des lésions observées au cours de la PB.

La pemphigoïde bulleuse fait partie d'un groupe hétérogène de pathologies : les dermatoses bulleuses auto-immunes (74). Ces dernières sont caractérisées par l'apparition de bulles cutanées, et la présence d'auto-anticorps dirigés contre les composants de la membrane basale dermo-épidermique, ou les jonctions interkératinocytaires. Ces auto-anticorps sont retrouvés dans le sang circulant, mais également sous forme de dépôts le long de la jonction dermo-épidermique, ou entre les kératinocytes de l'épiderme suivant la pathologie (1). Parmi les dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI), on distingue deux catégories. La première est le sous-groupe des pemphigus, ou DBAI intra-épidermiques, caractérisées par la présence de bulles intra-épidermiques et d'auto-anticorps ciblant les protéines du desmosome, responsable de la cohésion entre les kératinocytes (75). Le second est le sous-groupe des pemphigoïdes, ou DBAI sous-épidermiques, caractérisées par la présence de bulles sous-cutanées, et d'auto-anticorps dirigés contre les composants de la membrane basale dermo-épidermique. Dans ce sous-groupe des DBAI du type pemphigoïde, on retrouve la pemphigoïde bulleuse (PB), la pemphigoïde gestationnelle, la pemphigoïde membranaire muqueuse, l'épidermolyse bulleuse acquise, la pemphigoïde à p200, la dermatite herpétiforme et la dermatose linéaire à IgA (203).

La pemphigoïde bulleuse est la plus fréquente d'entre elles, et représente à elle seule plus de deux tiers des DBAI (70%) des DBAI (76). Elle touche particulièrement les

sujets âgés : le pic d'incidence est noté entre 66 et 83 ans, et 90% des individus atteints ont plus de 70 ans. L'âge moyen au diagnostic est de 80 ans. L'incidence dépend de la tranche d'âge considérée. Elle varie en fonction des zones géographiques, avec de fortes disparités entre les populations de l'Europe, des Etats-Unis et de l'Asie du Sud-Est. Elle reste néanmoins faible dans la population générale (2,5 à 42,8 par million d'habitants et par an, suivant les zones géographiques) (1) (Fig 8). Chez les plus de 90 ans, elle est de 460 cas par million et par an. En comparaison, chez les sujets de 50 à 59 ans l'incidence est seulement de 15 pour un million d'habitants et par an (70). Suivant les sources, entre 400 et 1000 PB sont diagnostiquées chaque année en France (76, 202). La prévalence de la PB suit la même répartition en fonction de l'âge, avec une personne sur 40 000 dans la population générale, mais augmente à une personne sur 3000 au-delà de 70 ans (77). Les hommes et les femmes sont autant concernés, même si l'on note une prédominance féminine avant 70 ans, et une inversion avec un plus grand nombre d'hommes atteints après 70 ans, se majorant après 80 ans d'après une étude allemande réalisée en 2016 (78).

Pays <i>(auteur - année)</i>	Type d' étude	Incidence <i>/10⁶ hb /an</i>
France (Bernard 1995)	Pros	7,4
Allemagne (Zillikens 1995)	Pros	6,6
Italie (Cozzani 2001)	Pros	10
Singapour (Wong 2002)	Retro	7,6
Allemagne (Bertram 2009)	Pros	13,4
Ecosse (Gudi 2005)	Retro	14
Koweït (Nanda 2006)	Retro	2,6
Royaume-Uni (Langan 2008)	Retro	42,8
Suisse (Marazza 2009)	Pros	12,1
France (Joly 2012)	Retro	23

Figure 8 : Incidence de la PB mesurée dans plusieurs pays à différentes époques.

Le taux de mortalité est élevé (30% après un an de traitement), d'autant plus que les sujets atteints sont fragiles, cumulent souvent plusieurs pathologies chroniques, et souffrent à la fois de complications infectieuses dues à la rupture de la barrière cutanée, et des complications iatrogènes de la corticothérapie et des immunosuppresseurs employés (79,80). La mortalité dépendra principalement de l'âge, des comorbidités associées (notamment neurologiques) et de la posologie de corticoïdes nécessaire au contrôle de la maladie.

2) Clinique

La pemphigoïde bulleuse est caractérisée par une triade clinique (203) :

- Développement de bulles tendues
- Plaques érythémateuses
- Prurit fréquent, intense et invalidant.

Les bulles sont des collections liquidiennes superficielles à contenu clair ou séro-hématique, de grande taille (>5mm). Ces bulles sont dites tendues (c'est-à-dire résistantes à la pression exercée par un doigt) : on parle d'absence de signe de Nikolsky. Cette absence de décollement cutané malgré la pression permet de les différencier des lésions bulleuses retrouvées dans le pemphigus. Les lésions bulleuses sont symétriques et se situent préférentiellement sur les faces de flexion des membres, la face antéro-interne des cuisses, l'abdomen (Fig 9). Elles apparaissent en périphérie de plaques érythémateuses et prurigineuses. Les lésions muqueuses sont rares, et généralement cantonnées à la muqueuse buccale (10 à 20% des cas). La pathologie évolue sur un rythme de poussées successives entrecoupées de période de rémission, et les bulles disparaissent sans laisser de cicatrices ni de grains de millium. Ces deux dernières caractéristiques cliniques constituent deux différences dans le diagnostic différentiel avec la pemphigoïde des muqueuses (ou pemphigoïde cicatricielle) (81).



Figure 9 : Exemples de manifestations cutanées de la PB : plaques érythémateuses, bulles tendues, localisation préférentielle sur les membres mais pouvant se généraliser à tout le corps, et lésions de grattage dues au prurit.

Certaines pemphigoïdes bulleuses se présentent sous une clinique atypique, compliquant alors le diagnostic. Une atteinte muqueuse associée est possible, dans ce cas c'est essentiellement la muqueuse buccale qui sera concernée. De même, si les lésions bulleuses épargnent généralement la tête et le cou, certaines formes peuvent concerner ces régions. D'autres formes touchent uniquement des zones anatomiques précises, c'est le cas des formes dyshidrosiformes, ou pré-tibiale. Il est rare que le sujet atteint ait moins de 70 ans, bien que cela soit possible. Surtout, certaines présentations cliniques sont exemptes de bulles. On parle dans ce cas de *prurit sine materia*, de PB eczématiforme ou vésiculeuse, d'érythrodermie ou de pemphigoïde nodulaire (fortement érythémateuse) (82).

3) Diagnostic

Le diagnostic repose sur la clinique, l'examen anatomo-pathologique d'une biopsie de peau et la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes de la jonction. Ces anticorps sont recherchés *in situ*, par l'analyse d'une biopsie de peau, ou sous forme libre circulante, à partir d'un échantillon sanguin. Le diagnostic clinique a déjà été évoquée dans la partie C2).

L'analyse histologique est réalisée en peau lésée : plusieurs coupes de la biopsie incluse en paraffine sont marquées par plusieurs colorants cellulaires (hématoxyline, éosine, safran). La mise en évidence d'une bulle sous-épidermique sans acantholyse est l'élément diagnostic majeur. En fonction de l'avancée de la pathologie, il peut être retrouvé un infiltrat inflammatoire riche en polynucléaires éosinophiles (PNE). Ces derniers sont localisés dans la bulle dermo-épidermique, ou le long de la jonction. La biopsie pour recherche d'autoanticorps par immunofluorescence directe (IFD) est réalisée sur la peau péri-lésionnelle. La biopsie est congelée dans l'azote liquide, puis après coupe à congélation, les anticorps et le complément déposés dans le tissu sont révélés par des anticorps dirigés contre les différents isotypes d'immunoglobulines et le complément. Le diagnostic est confirmé par la présence de dépôts linéaires d'immunoglobulines G (IgG) +/- du fragment C3c du complément le long de la JDE (83).

La recherche d'auto-anticorps circulants spécifiques de protéines de la JDE repose sur plusieurs techniques. Dans le cadre du diagnostic de la PB, les immunoglobulines d'isotype IgG sont recherchées, à l'aide d'un anticorps conjugué au FITC et reconnaissant les domaines constants des IgG. L'examen de dépistage est l'immunofluorescence indirecte (IFI). En routine, l'IFI est le plus souvent réalisée sur des coupes d'œsophage de singe. Cependant, la recherche sur peau clivée (de singe ou humaine) par du NaCl 1M est plus performante en termes de sensibilité pour les pemphigoïdes (84). Dans tous les cas, la mise en évidence d'un dépôt d'IgG le long de la membrane basale dermo-épidermique, retrouvé dans 70 à 90% des cas (76), est fortement évocatrice du diagnostic de pemphigoïde bulleuse. En immunofluorescence indirecte, le titre des auto-anticorps, bien qu'étant une donnée semi-quantitative, est globalement corrélé à l'activité de la maladie (85). Lorsque l'analyse est réalisée sur peau clivée au NaCl 1M, les jonctions de l'hémidesmosome sont rompues, et le dépôt des auto-anticorps peut se faire sur le versant épidermique (au toit de la bulle) ou le versant dermique (sur le plancher de la bulle) suivant la cible des auto-anticorps. Dans la pemphigoïde bulleuse, les deux cibles des auto-anticorps sont situées sur le versant épidermique (Fig 10).

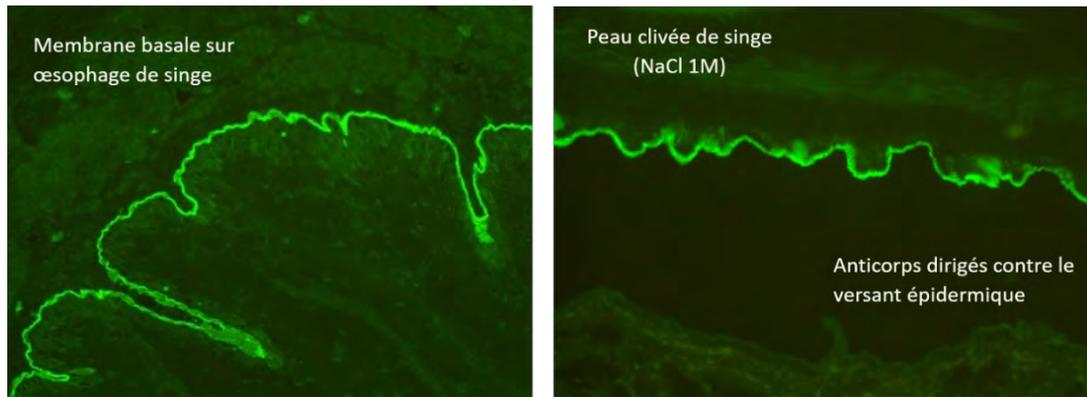


Figure 10 : Images obtenues en immunofluorescence indirecte sur œsophage de singe (à gauche) et sur le versant épidermique de la peau clivée de singe (à droite). Le marquage le long de la jonction dermo-épidermique se voit de façon nette.

L'identification des cibles antigéniques était historiquement effectuée par immunotransfert (86). Depuis la découverte des cibles antigéniques et la détermination de leur structure, puis le développement de tests ayant une grande sensibilité diagnostique, cette recherche est désormais effectuée par la combinaison de deux test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (87,88). A nouveau, seules les IgG spécifiques sont mises en évidence, par un conjugué couplé à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP). La BP180 est la cible principale des auto-anticorps de la pemphigoïde bulleuse. Deux tests ELISA commerciaux existent actuellement, et permettent la détection d'auto-anticorps dirigés contre le domaine NC16A de la BP180. Dans les deux cas, c'est seulement une partie de la BP180 qui est adsorbée sur les puits des plaques ELISA : soit un tétramère du domaine NC16A (Fig 11), basé sur l'ADNc humain et produit par E. coli (kit Euroimmun®) soit un domaine NC16A recombinant (kit MBL®/Mesacup®). Plus de 90% des patients atteints de PB possèdent ces auto-anticorps spécifiques du domaine NC16A (88).

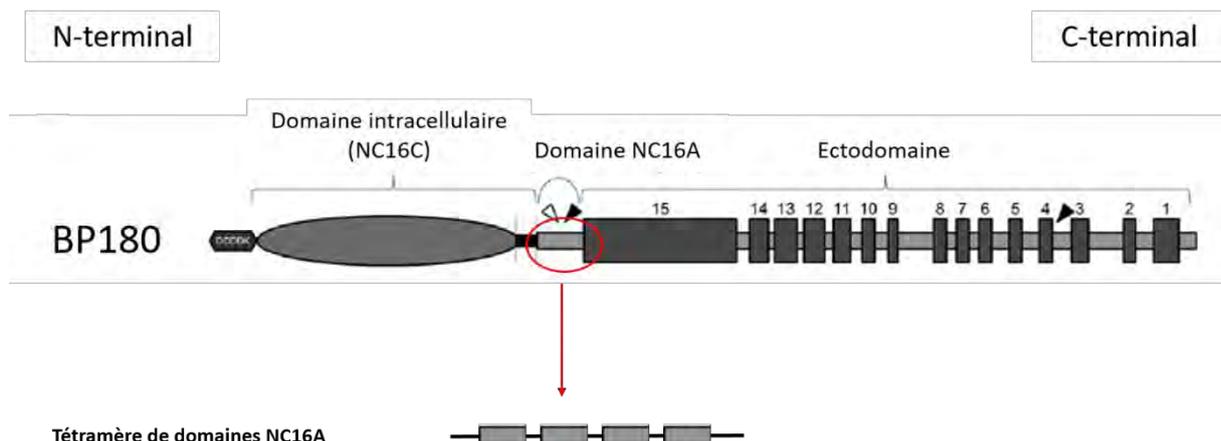


Figure 11 : Tétramère de domaine NC16A présent dans les puits des kits Euroimmun. Les puits de polystyrène sont recouverts de cet antigène. Le sérum est dilué au 1 :101 puis un anticorps anti-IgG couplé à la peroxydase de raifort est ajouté en tant qu'anticorps secondaire. Le titre est indiqué en unités arbitraires par mL (U/mL). Un résultat supérieur au seuil de 20 U/mL est considéré comme positif.

Le titre des anticorps dirigés contre le domaine NC16A de la BP180 est corrélé à l'activité clinique de la maladie (88,89), et permet de prédire une rechute en cas d'arrêt du traitement. Une étude a démontré que lorsque le taux d'anticorps anti-NC16A dépasse un seuil de 27 U/mL était associée une valeur prédictive positive de 90,9% pour la survenue de rechutes au cours de la 1ère année de traitement (étude réalisée avec le kit Euroimmun®, (90). Malgré une forte mortalité (environ 30% à un an), multifactorielle car les patients sont âgés, potentiellement atteints d'autres maladies chroniques (79,91), la guérison peut être obtenue après plusieurs mois ou années de traitement.

Chez 60% des patients, on retrouve des auto-anticorps dirigés contre une autre protéine de l'hémidesmosome, localisée au niveau intracellulaire : la BP230 (Fig 12) (92).

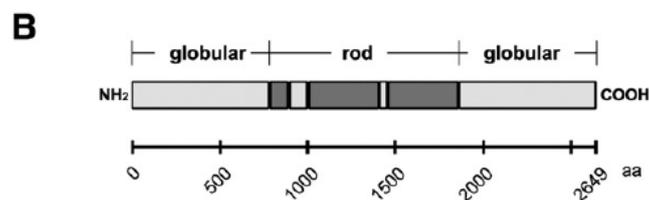


Figure 12 : Structure de la BP230 : les fragments N- et C- terminaux sont des régions globulaires. Au centre la BP230 a une forme de baguette. Cette protéine est exclusivement intracellulaire (93).

Le principal rôle des tests permettant la détection des anticorps anti-BP230 est de confirmer le diagnostic de pemphigoïde bulleuse chez les rares patients négatifs en ELISA BP180 NC16A. La combinaison des deux tests diagnostic permet d'augmenter la sensibilité à plus de 95% (18,92), et d'obtenir une spécificité proche de 99% (92,94). Deux tests ELISA sont principalement utilisés en routine pour la détection des anticorps anti-BP230. A nouveau, l'antigène fixé sur les puits n'est pas la protéine entière, mais un fragment particulièrement antigénique de la protéine. Dans le kit Euroimmun®, l'antigène est un fragment recombinant du domaine C-terminal de la BP230. Pour le kit MBL®/Mesacup®, il s'agit d'un fragment recombinant contenant les domaines N- et C- terminaux de la protéine.

Dans de rares cas, l'immunofluorescence électronique directe, réalisée sur une biopsie de peau périlucide, permet de visualiser précisément les structures de l'hémidesmosome. Dans la PB, les dépôts d'IgG et de C3 seront localisés dans la partie haute de la lamina lucida. Cette technique est aujourd'hui anecdotique.

Une étude française a défini quatre critères cliniques permettant de porter le diagnostic de pemphigoïde bulleuse. Ces critères sont (1) un âge supérieur à 70 ans, (2) l'absence d'atteinte muqueuse, (3) l'absence de cicatrices atrophiques, (4) une localisation épargnant la tête, le cou et la moitié supérieure du tronc. Lorsque trois de ces critères sont présents, et associés à des dépôts d'IgG et/ou de C3 en IFD, le diagnostic peut être posé avec une probabilité supérieure à 90% (81). En définitive, le diagnostic repose essentiellement sur des critères cliniques, associés à l'examen de la biopsie en IFD. Devant une présentation clinique atypique, les tests d'identification de la cible des auto-anticorps deviennent indispensables. Une fois le diagnostic posé,

le dosage des IgG anti-BP180 par technique ELISA permettra de suivre l'activité de la maladie et de prédire une rechute à l'arrêt des traitements (90).

4) Traitements

La pemphigoïde bulleuse est une maladie auto-immune médiée par les anticorps. Jusqu'à la fin des années 1990, la stratégie thérapeutique de choix était l'emploi d'une corticothérapie systémique. Le principal objectif de ce traitement était le blocage de la production de ces auto-anticorps et l'inhibition de la libération des médiateurs de l'inflammation. L'emploi de glucocorticoïdes est néanmoins accompagné de nombreux effets indésirables, autant par leur versant immunosuppresseur que par les effets sur le métabolisme (restriction hydrosodée, retard à la cicatrisation, ostéoporose, déséquilibre glycémique, insuffisance corticosurrénalienne). Ces effets indésirables sont particulièrement délétères chez la population concernée par cette pathologie : le sujet âgé. La stratégie thérapeutique a évolué, notamment en France, avec un changement des pratiques : un contrôle de l'inflammation cutanée est désormais préféré à une immunosuppression systématique. Le principal objectif est d'obtenir une qualité de vie satisfaisante avec la disparition des bulles cutanées et du prurit, tout en évitant l'emploi d'une corticothérapie systémique ou d'autres agents immunosuppresseurs. En première intention, c'est désormais l'emploi de dermocorticoïdes (glucocorticoïdes à usage local cutané) qui prime. Suivant le contexte (patient hospitalisé, en institution, éventuellement avec des troubles cognitifs) et la sévérité de la pathologie au diagnostic, le patient pourra être hospitalisé, ou bénéficiera d'un suivi rapproché en hospitalisation de jour ou en ambulatoire. L'efficacité du traitement sera jugée par le dermatologue, sur des critères essentiellement cliniques. Le suivi est hebdomadaire jusqu'à l'obtention d'un contrôle clinique. Le traitement local sera ensuite poursuivi, avec un suivi mensuel les trois premiers mois, puis plus espacé. L'arrêt du traitement sera décidé par le dermatologue et le patient, en fonction du contexte et des comorbidités. Le titre des auto-anticorps spécifiques de la BP180 a également sa place dans la décision, la persistance d'un taux élevé d'anticorps circulants prédisant une rechute à l'arrêt du traitement (203, 204).

Le traitement est adapté à la présentation clinique et à la sévérité de la pathologie au diagnostic. La stratégie thérapeutique initiale consiste en l'utilisation de dermocorticoïdes : la corticothérapie locale permet un contrôle des lésions chez plus de 90% des patients atteints de formes multi-bulleuses (95,96). En cas de contrôle insuffisant de la pathologie, il est possible d'augmenter la posologie de dermocorticoïdes, ou d'ajouter une corticothérapie systémique. Ce sont les seules molécules qui ont l'AMM pour cette indication, toutes les autres thérapeutiques utilisées et notamment les immunosuppresseurs sont hors AMM. Le propionate de clobétasol (spécialités : Dermoval et Clarelux) est indiqué seul en première intention. Si la corticothérapie systémique est envisagée, c'est la prednisone qui est employée, toujours en association avec les dermocorticoïdes. D'autres médicaments peuvent

être employés : la dapsons (spécialité Disulone), un antibiotique de la famille de sulfones, la doxycycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines, peuvent être associés à la corticothérapie locale. Ces derniers ont une efficacité inconstante (203).

De nombreux immunosuppresseurs peuvent être employés. Leur utilisation permet de restreindre l'usage des corticoïdes systémiques en cas de contre-indication. Ils s'accompagnent néanmoins d'effets indésirables, liés à l'immunosuppression qu'ils induisent, ainsi qu'à un degré variable de toxicité hématologique. Parmi ces thérapeutiques, citons le méthotrexate, le mycophénolate mofétil, l'azathioprine, le rituximab. Récemment de nombreuses données pré-cliniques et des cas rapportés en clinique ont suggéré une efficacité de l'omalizumab. Le recours aux échanges plasmatiques, ou aux immunoglobulines intraveineuses à usage thérapeutique (IgIV) est réservé à des cas particulièrement sévères et résistants aux traitements. De nombreuses autres thérapeutiques pourraient envisagées, mais restent encore au stade théorique (97).

D) Physiopathologie de la pemphigoïde bulleuse

De nombreux modèles animaux ont été développés pour étudier les différents acteurs du processus physiopathologique à l'origine du développement de la PB. Des données recueillies chez l'Homme ont également permis d'approfondir sa compréhension. Les acteurs cellulaires et moléculaires sont nombreux, et la physiopathologie n'est pas complètement élucidée à ce jour. Un modèle « classique » de la PB fait intervenir les auto-anticorps, le complément, certaines cellules de l'immunité innée et de nombreuses protéases. Cependant, ce modèle ne permet pas d'expliquer toute la physiopathologie de la PB. En effet, celle-ci est probablement bien plus complexe, avec l'implication de différents isotopes et sous-classes d'auto-anticorps (IgG1, IgG4, IgE) et d'acteurs cellulaires dont le rôle était méconnu ou sous-estimé (mastocytes, polynucléaires éosinophiles) (69,98).

On retrouve dans le développement de la pemphigoïde bulleuse la plupart des caractéristiques qui permettent ensuite son diagnostic. Dans un premier temps, comme pour tout maladie auto-immune, une rupture de tolérance va se produire. Les facteurs favorisant le développement de la PB sont multiples, et comprennent l'âge, l'environnement, certains médicaments (99). Après cette rupture de tolérance, des lymphocytes T et B spécifiques d'épitopes portés par la JDE vont être activés. Les IgG spécifiques de la BP180 +/- de la BP230 seront donc produits par des plasmocytes médullaires issus de la différenciation de lymphocytes B auto-réactifs. Ces auto-anticorps vont circuler dans le sang périphérique, et se déposer le long de la JDE sur leurs cibles. La reconnaissance de l'antigène induit un changement conformationnel de l'immunoglobuline, qui permet la fixation et l'activation de la voie classique du complément. Cette voie aboutit au recrutement et au clivage du C3 en C3a et C3b, et du C5 en C5a et C5b. Les fragments solubles C3a et C5a sont des médiateurs chimiotactiques fortement pro-inflammatoires. Ils vont attirer de nombreuses cellules de l'immunité innée, essentiellement des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles. Le processus inflammatoire recrute également les mastocytes du derme sous-jacent.

Un grand nombre de protéases et de facteurs pro-inflammatoires sont libérés localement (élastase neutrophile, métalloprotéases matricielles, ...) et contribuent à amplifier et entretenir l'inflammation. Les grandes voies de signalisation pro-inflammatoires sont activées, avec la synthèse d'interleukine 6 (IL-6) et d'IL-8 notamment (69,100).

De nombreuses équipes de recherche ont étudié la physiopathologie de la PB au travers de modèles murins, par transfert passif d'anticorps de patients à des souris. Les premières tentatives chez la souris se sont soldées par des échecs (101). En effet, les auto-anticorps humains ne reconnaissent pas le domaine NC14 (l'équivalent structural murin du domaine NC16A humain), ne se fixent pas à la jonction, et n'induisent donc pas de pathologie bulleuse (44). La principale difficulté à développer tout autre modèle animal de pemphigoïde bulleuse par transfert passif des auto-anticorps humains s'explique par la très forte variabilité du domaine NC16A chez la plupart des espèces mammifères. Les séquences des BP180 de différentes espèces ont été alignées et comparées, notamment pour étudier la conservation de sites d'interaction, de sites de clivage ou importants pour la fonction de la BP180. Ces résultats sont présentés en annexe (Annexes 2 et 3).

Pour mettre au point le premier modèle murin de PB, Liu et ses collaborateurs ont immunisé des lapins en leur injectant des fragments de BP180 murine. Le transfert passif des immunoglobulines de lapin chez des souris nouveau-nées a permis le développement en 18h d'un phénotype se rapprochant de celui de la pemphigoïde bulleuse (détachement de la peau). Des biopsies réalisées post-mortem ont révélé des dépôts d'IgG de lapin et de fragment C3 de souris le long de la JDE, ainsi que la formation de bulles sous-épidermiques, révélant un processus physiopathologique semblable à celui de la PB (102). La même équipe a ensuite étudié les acteurs de la formation de la bulle sous-épidermique dans ce modèle (56,103,104). Le rôle du complément, des polynucléaires neutrophiles et de l'élastase neutrophile semble central dans ce modèle physiopathologique. La figure 13 est extraite d'une revue présentant le mécanisme physiopathologique de la PB, dans lequel les polynucléaires neutrophiles, le complément et les protéases exercent un rôle prépondérant.

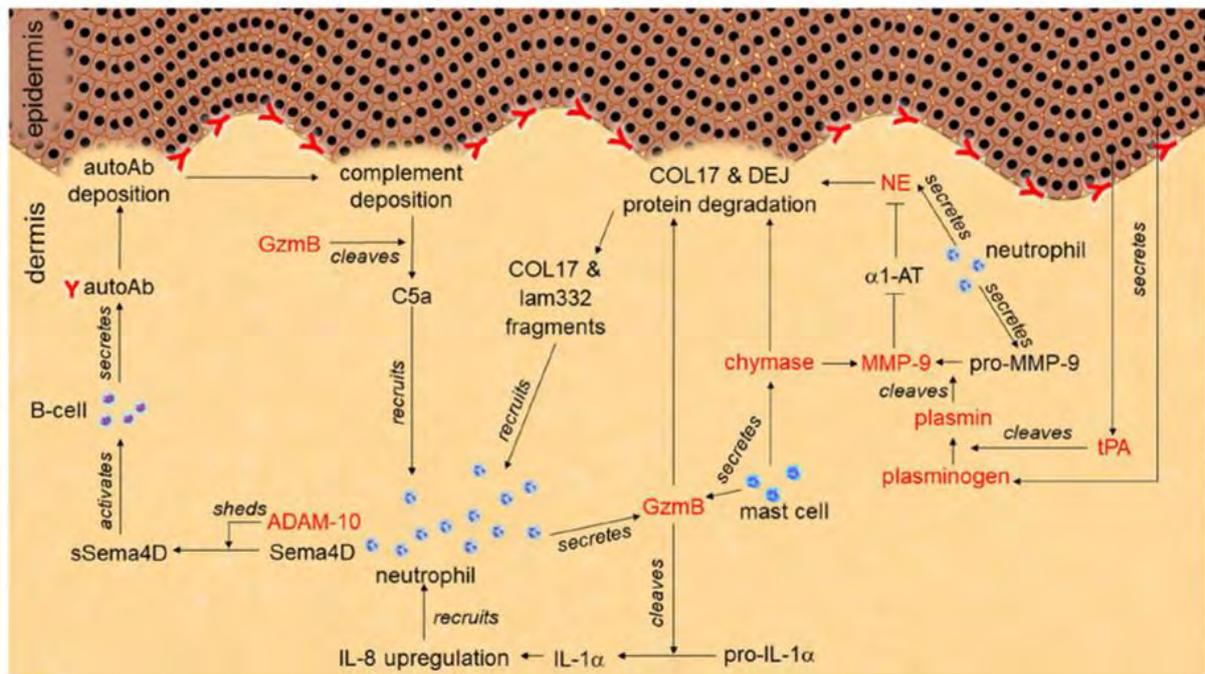


Figure 13 : La physiopathologie "classique" de la pemphigoïde bulleuse. Le dépôt des auto-anticorps permet le dépôt du complément le long de la jonction dermo-épidermique. La libération du facteur chimiotactique C5a recrute des polynucléaires neutrophiles. De leur côté, les kératinocytes sécrètent l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) qui active le plasminogène en plasmine. Ce dernier permet l'activation du pro-MMP9 en MMP9 (métalloprotéase matricielle 9). La MMP9 dégrade alors l' α -1-anti-trypsine (α 1-AT). La neutrophile élastase (NE) des neutrophiles n'est alors plus inhibée, et permet donc la dégradation des protéines de la jonction dermo-épidermique (dont la BP180, ou COL17A1). Ce processus inflammatoire est entretenu par la sécrétion de granzyme B, de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-8) ainsi que d'autres protéases, non représentées sur ce schéma (100).

Le domaine NC16A est la cible majoritaire des auto-anticorps retrouvés chez les patients atteints de PB (94). Les anticorps dirigés contre le domaine NC16A et capables d'activer le complément seraient responsables de la pathologie (105). Plusieurs modèles murins ont donc été développés, en remplaçant la BP180 murine par l'humaine (106) ou seulement le domaine NC14 de la BP180 murine par le domaine NC16A humain (107) L'injection de sérum ou d'immunoglobulines humaines conduit alors au développement d'une pathologie proche de la PB, avec des dépôts d'IgG et de complément le long de la jonction et l'apparition de bulles cutanées, ou d'un décollement de l'épiderme.

Au-delà de la physiopathologie « classique » dépendante du complément, plusieurs auteurs ont démontré que certains anticorps dirigés contre le domaine NC16A auraient un effet pathogène indépendant du complément. L'injection de fragments F(ab')₂ provoque une diminution de l'expression de la BP180 in vitro, et une fragilité cutanée chez la souris après injection intrapéritonéale (49). Une autre équipe a utilisé des IgG dirigées contre la BP180 mais dans un modèle de souris déficiente en C3, et met également en évidence un mécanisme indépendant du complément (108). Ce mécanisme physiopathologique passerait par l'internalisation de la BP180 par endocytose, et la diminution de l'adhérence des kératinocytes (109,110). Seuls les

anticorps dirigés contre le domaine NC16A seraient pathogènes sans l'action du complément, en provoquant l'internalisation de la BP180, probablement en raison de la proximité du domaine avec la membrane plasmique. Les anticorps ciblant des domaines plus éloignés, particulièrement si ces derniers sont situés proche de l'extrémité C-terminale de la BP180, ne peuvent pas induire cette internalisation (111).

Cependant, les auto-anticorps retrouvés dans le sérum de patients atteints de PB ne ciblent pas uniquement le domaine NC16A de la BP180. Dans la plupart des maladies auto-immunes, le déclenchement de la pathologie est souvent dû à la rupture de tolérance vis-à-vis d'un épitope précis, mais l'inflammation et la destruction tissulaire qui s'ensuivent conduisent à la présentation de nouveaux épitopes aux lymphocytes B, et l'apparition de nouveaux auto-anticorps dirigés contre des épitopes secondaires. Ce phénomène est appelé « epitope spreading » (112) et il est retrouvé dans la PB (113). L'inflammation, la dégradation de la BP180 en peptides immunogènes par les nombreuses protéases et la présentation aux cellules immunitaires recrutées sur le site de l'inflammation vont participer à ce phénomène d'« epitope spreading ».

Une équipe de recherche a particulièrement étudié ce phénomène, chez la souris (114). En plus des anticorps dirigés contre le domaine NC16A, ils retrouvaient également de façon précoce d'autres auto-anticorps, spécifiques des régions N- et C-terminales de la BP180. Chez l'Homme, cette équipe a étudié ce phénomène et a également montré que des anticorps spécifiques des domaines intra- et extracellulaires étaient retrouvés dans l'histoire naturelle de la maladie (20,93,115). La comparaison avec les caractéristiques clinique a montré que la présence d'anticorps spécifiques de plusieurs épitopes de la BP180 (en plus du domaine NC16A) est associée à un phénotype plus inflammatoire. Le rôle pathogène propre de ces auto-anticorps capables de reconnaître les parties N- et C-terminales de la BP180 est encore incompris. Une étude incluant 87 patients a différencié les profils des anticorps retrouvés chez les patients atteints de PB. Chez une fraction d'entre eux, aucun anticorps ciblant le domaine NC16A n'a été retrouvé, pourtant leur sérum contenait des anticorps capables de reconnaître d'autres épitopes de la BP180. Le phénotype développé chez ces patients était celui d'une PB moins inflammatoire (19). La présence d'anticorps anti-NC16A associée à des auto-anticorps reconnaissant d'autres épitopes de la BP180 est quant à elle associée à un phénotype plus inflammatoire, plus de lésions muqueuses, et un score d'activité de la maladie plus élevé (23,115,116).

La BP180 n'est pas la seule cible des auto-anticorps dans la PB. La BP230 fait partie de l'hémidesmosome, et est la cible d'auto-anticorps chez environ 60% des patients atteints de PB. Le rôle pathogène propre d'auto-anticorps dirigés contre la BP230 a été montré dans un modèle murin (117). Certains patients atteints de PB ne possèdent d'ailleurs pas d'anticorps détectés par l'ELISA anti-NC16A. Se pose donc la question d'un mécanisme physiopathologique où les auto-anticorps cibleraient uniquement la BP230, protéine intracellulaire et donc théoriquement inaccessible aux anticorps.

Plusieurs équipes ont étudié le transport d'anticorps à l'intérieur des cellules, et la fonction de récepteurs intracellulaires au fragment Fc des Ig (118). De nombreuses hypothèses ont été faites quant aux conséquences du passage des anticorps au niveau intracellulaire (119). Cependant, le rôle pathogène des anti-BP230 reste méconnu, et a été largement moins étudié que celui des anticorps spécifiques de la BP180. Une revue récente résume les connaissances actuelles sur le rôle des anti-BP230 dans la PB (17). Dans une étude récente, en l'absence de lymphocytes T régulateurs, les souris « scurfy » (FoxP3^{-/-}) développent spontanément des manifestations cutanées, et des anticorps dirigés contre la BP180, mais également la BP230 murines (120). Le développement de modèle « spontanés » de PB chez la souris s'accompagne donc de l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre la BP180 et la BP230, mettant à nouveau en évidence ce phénomène d'« epitope spreading » et de mécanismes physiopathologiques encore méconnus.

Les kits commerciaux disponibles recherchent les IgG sans en différencier la ou les sous-classe(s). Peu d'études sur les sous-classes d'IgG ont été réalisées en ELISA, la plupart des auteurs ont recherché les sous-classes d'IgG1 à 4 par IFI, IFD ou immunoblot. Plusieurs types d'immunoglobulines dirigées contre le domaine NC16A ont été retrouvées par immunoblot dans le sérum des patients atteints : IgG1, IgG4, IgE (3). Des anticorps d'isotype IgG1 et IgG4 dirigés contre les domaines intra- ou extracellulaires de la BP180 sont retrouvés chez 40 à 60% des patients en immunoblot (121). L'analyse des biopsies de peau en IFD retrouve également majoritairement des IgG4, ainsi que des IgG1 et IgG3 déposées le long de la jonction, exceptionnellement des IgG2 (122). Toutefois, aucune corrélation entre la prédominance d'une sous-classe particulière d'IgG et la présentation clinique ou la durée de la maladie n'a pu être mise en évidence. Concernant les anticorps anti-BP230, ils semblent être majoritairement d'isotype IgG1 et IgG4, comme le montre une étude ayant recherché les quatre sous-classes d'IgG dirigés contre la BP180 et la BP230 par ELISA (5).

Alors que les IgG1, capables d'activer le complément, étaient supposées comme majoritairement responsables de la pathologie, les patients possèdent donc fréquemment des IgG4 et des IgE spécifiques du domaine NC16A et d'autres épitopes de la BP180. Or les IgG4 et les IgE n'activent pas le complément. Les IgG4 pourraient être impliquées dans le mécanisme pathogène indépendant du complément précédemment évoqué. Plusieurs cas cliniques ont été rapportés de patients où seuls des dépôts d'IgG4 étaient retrouvés le long de la jonction, en absence de complément (123). Le développement d'une PB en l'absence d'IgG1 et d'activation du complément est donc possible chez l'Homme, et pas seulement *in vitro*. La liaison d'IgG spécifiques de la BP180 pourrait également déclencher la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les kératinocytes, et ainsi être à l'origine d'une inflammation locale (124). Les deux mécanismes physiopathologiques complément dépendant et indépendant sont très certainement non exclusifs, et suivant le profil d'auto-anticorps du patient ils auront une importance relative. Le schéma suivant présente l'hypothèse de l'existence de

deux mécanismes physiopathologiques, dépendant ou non du complément, en fonction de la présence d'IgG1 et d'IgG4 dirigés contre la BP180 (Fig 14).

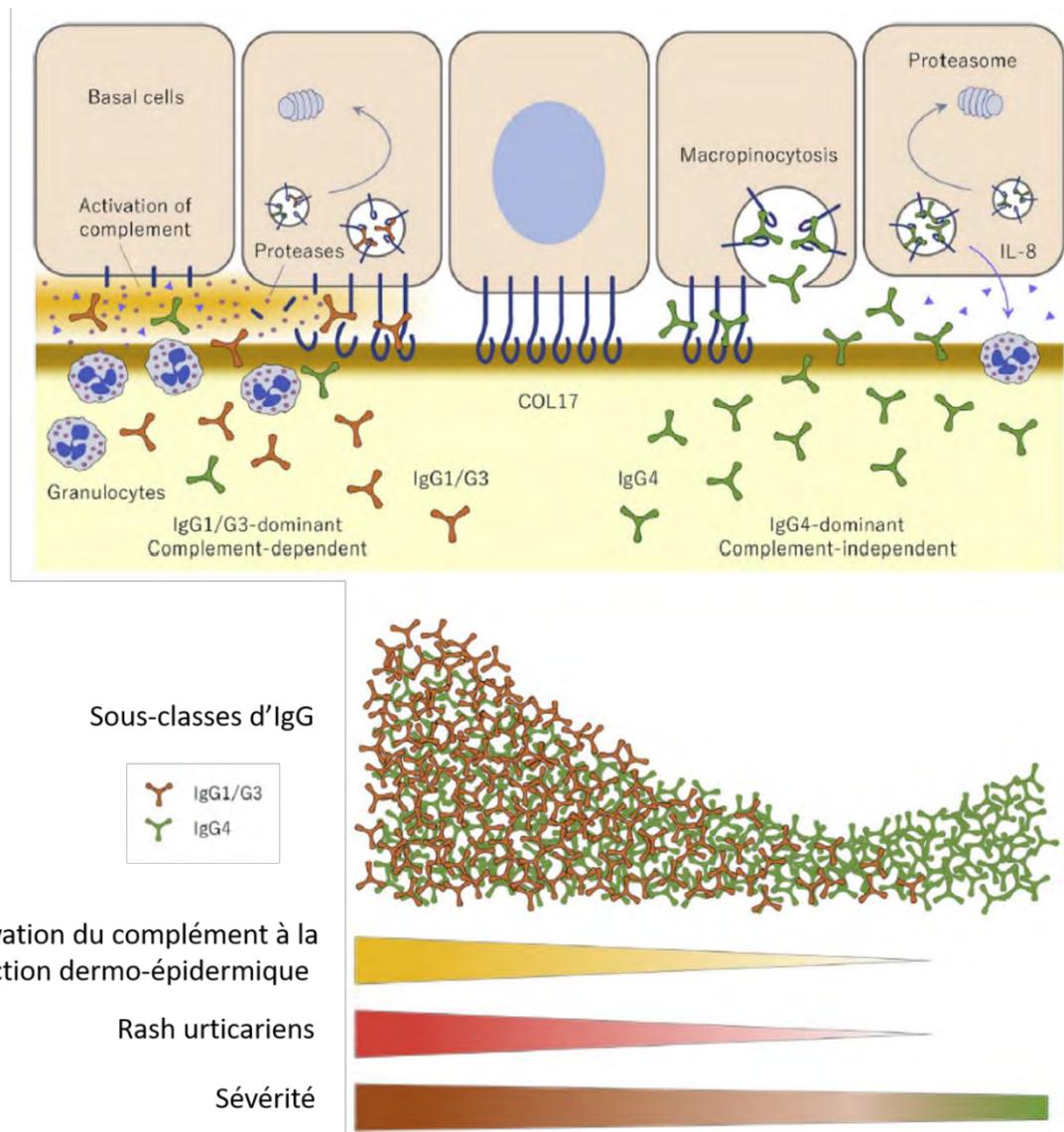


Figure 14 : Mécanismes physiopathologiques des pemphigoïdes bulleuses, dépendants ou indépendants du complément en fonction de la sous-classe d'IgG retrouvée. Au dessus, la partie gauche décrit une physiopathologie dépendant du complément et de la présence de polynucléaires neutrophiles. A droite, les IgG4 n'activent pas le complément et provoque l'internalisation de la BP180 et le détachement du kératinocyte. Dessous, le rapport entre la clinique, la composante majoritaire et la sévérité. A partir de (125). Schéma décrivant plusieurs hypothèses dont certaines n'ont pas été démontré *in vivo*.

Une équipe a étudié *in vitro* et *in vivo* la compétition des sous-classes d'IgG au niveau de la BP180 et de la jonction dermo-épidermique. La présence d'IgG4 pourrait conférer un effet protecteur, en entrant en compétition avec les IgG1 et IgG3 pour la liaison le long de la jonction, l'activation du complément, la liaison aux récepteurs Fcγ et le développement d'une inflammation locale (126).

Les mécanismes physiopathologiques de la pemphigoïde bulleuse ne sont pas encore à ce jour entièrement élucidés. Il est d'ailleurs probable qu'il existe en réalité plusieurs phénomènes non exclusifs pouvant être à l'origine de cette pathologie. Les signes cliniques développés par les patients sont d'ailleurs variables, tout comme le sont la sévérité de la maladie et la réponse thérapeutique aux différents traitements. Plus récemment, le rôle pathogène des IgE a été démontré, et particulièrement étudié par de nombreuses équipes de recherche.

E) Rôle des IgE dans la pemphigoïde bulleuse et implication thérapeutique

Il est connu depuis longtemps que 50 à 70% des patients atteints de PB ont des taux d'IgE totales circulantes élevés, voire très élevés (127–131). Le taux d'IgE totales est mesuré au moment du diagnostic, certaines études ayant montré qu'il était lié au pronostic et à la sévérité de la maladie. En revanche, l'association d'un taux élevé d'IgE avec un phénotype particulier (particulièrement prurigineux et érythémateux) n'est pas systématiquement retrouvée (132). Fairley et ses collaborateurs ont rapporté la présence d'IgE dirigées contre la BP180 chez une petite série de patients (n=10). 50% d'entre eux possédaient des IgE dirigées contre le domaine NC16A (133).

Le rôle pathogène d'IgE spécifiques de protéines de la jonction a été étudié à l'aide de différents modèles murins (10,134). Plusieurs études cliniques ont démontré la présence d'IgE spécifiques de la BP180 et de la BP230 dans le sérum de patients atteints. Ces études donnent des conclusions contradictoires quant à la corrélation de la présence de ces IgE spécifiques avec la sévérité de la maladie, ou une présentation clinique particulière, comme le résumant ces revues (9,132,135). Toutefois, le rôle pathogène des IgE anti-BP180 semble établi, et a mené à l'utilisation d'un traitement initialement développé pour traiter les maladies allergiques IgE-médiées : l'omalizumab (spécialité : XOLAIR). Cet anticorps monoclonal thérapeutique est dirigé contre le fragment CH3 des IgE. Plusieurs cas de succès thérapeutique de l'omalizumab ont été rapportés, chez des patients présentant une pemphigoïde bulleuse résistante aux traitements de première ligne (corticothérapie locale ou systémique) (13,15) voire au Rituximab (14).

Dans un modèle murin, l'équipe de Fairley a démontré que les IgE anti-BP180 jouent un rôle pathogène à elles seules (134). Dans ce modèle, des souris nude ont reçu une greffe de peau humaine. Les souris ont reçu par transfert passif des IgE totales purifiées, issues à partir de sérum de patients atteints de PB ou de personnes saines. Les souris ayant reçu les IgE des patients atteints de PB ont développé des plaques d'urticaire, et l'analyse histologique a montré un infiltrat inflammatoire composé de PNN, de PNE et de mastocytes. Un second modèle murin de PB dépendante des IgE a été développé (10). Des anticorps hybrides, d'isotype IgE murin (pour la partie constante) capables de reconnaître le fragment LABD97 humain (pour la partie variable) ont été générés et injectés en sous-cutané à des souris SCID ayant reçu une greffe de peau humaine. La greffe de peau humaine a développé un érythème et un

prurit, une dizaine de jours après l'injection des IgE. Aucune bulle clinique ne s'est développée, mais l'analyse histologique des greffons de peau humaine a révélé la formation de bulles sous-épidermiques et d'un infiltrat riche en PNE. Lorsque les IgE étaient injectées en intradermique dans la peau humaine, les manifestations cliniques débutaient dès 15 minutes. Ces IgE, une fois fixées sur les récepteurs Fcε des mastocytes humains présents dans la peau, pourrait provoquer leur dégranulation (136).

La présence d'IgE spécifiques des protéines de la jonction dermo-épidermique a été recherchée dans le sang circulant, par des auteurs ayant utilisé différents systèmes ELISA. Dans un premier temps, plusieurs équipes ont montré que les IgE spécifiques de la BP180 étaient essentiellement des IgE dirigées contre le domaine NC16A (3,4,133). Les auteurs ont par la suite développé des tests à l'aide des plaques ELISA des kits commerciaux existants, revêtues de l'antigène NC16A, ou des tests ELISA maison. Certaines IgE sont également capables de reconnaître le domaine intracellulaire de la BP180 (4). Iwata et ses collaborateurs trouvent 22% de positivité sur 37 patients, en utilisant le kit ELISA MBL® (5). Avec le même kit, une autre équipe trouve 30% de positifs sur 67 patients (137). La plus grande série publiée comprend 117 patients, et 40% des patients testés sont positifs en ELISA Euroimmun® (138). D'autres auteurs ont mis au point des tests ELISA « maison » et décrivent entre 20 et 45% de positivité (3,6,11). Certains auteurs (137,139,140) ont comparé les résultats avant et après déplétion des IgG, et obtiennent des résultats similaires. Un système de puce ISAC, capable de détecter des IgE et des IgG dirigées contre le domaine NC16A (7) a donné les mêmes résultats.

Les IgE dirigées contre la membrane ont également été recherchée au niveau de la barrière dermo-épidermique de patients atteints de PB (8,12,139,141,142). Les résultats sont très contradictoires, car le taux de positivité des IgE déposées le long de la jonction est variable : de 10% à 45%. L'étude la plus documentée, après l'analyse de 100 biopsies de patients, conclue à 18% de positivité, et une valeur diagnostique ajoutée nulle par rapport aux examens disponibles (soit ELISA BP180 NC16A et IFD) (12). De plus aucune corrélation n'a été retrouvée dans cette série entre la présence d'IgE au niveau de la jonction et la présentation clinique. Le mécanisme d'action des IgE passerait par leur liaison aux mastocytes tissulaires, qui déclencherait la dégranulation de ces cellules. La présence conjointe de PNE dans les tissus des patients atteints suggère que ces cellules pourraient également être impliquées. Il a été montré que les PNE peuvent exprimer le récepteur Fcε1 de forte affinité pour les IgE chez des patients PB (143). Deux revues résument les fonctions des PNE dans la PB (9,144) et leur présence dans les tissus semble corrélée à l'activité de la maladie (145). Par ailleurs, une autre équipe montre que les IgE de patients atteints de PB sont majoritairement retrouvées près de la jonction, dans le derme, à la surface de cellules exprimant le RFcε (PNE et mastocytes) (146). Cette étude suggère un rôle propre aux IgE, capables de déclencher certains signes cliniques retrouvés dans la PB (érythème, prurit). Dans un modèle murin où le récepteur Fcε1 des polynucléaires éosinophiles et le domaine NC16A de la BP180 ont été humanisés, l'injection d'IgE

anti-NC16A humaines provoque un décollement de la peau (147). Ce rôle propre des IgE anti-BP180 semble dépendre de la présence d'éosinophiles dans les tissus et de leur capacité à déclencher des mécanismes IgE médiés.

Globalement, la plupart des études concordent pour retrouver ces IgE spécifiques de la BP180 entre 40 et 70% des patients étudiés. La mise en évidence de ces IgE spécifiques a conduit à l'hypothèse que ces IgE jouent un rôle dans la physiopathologie de la PB. Tout comme les IgG4, les IgE n'activent pas le complément, elles déclencheraient l'internalisation de la BP180 (148). Par ailleurs, les IgE ne se fixeraient pas forcément le long de la jonction : elles sont préférentiellement liées aux récepteurs Fcε des cellules du derme (éosinophiles et mastocytes). Elles déclencheraient alors leur dégranulation après reconnaissance d'épitopes pouvant être présents sur des fragments de digestion de la BP180 (149). La figure 15 présente cette hypothèse de mécanisme d'action dépendant des IgE.

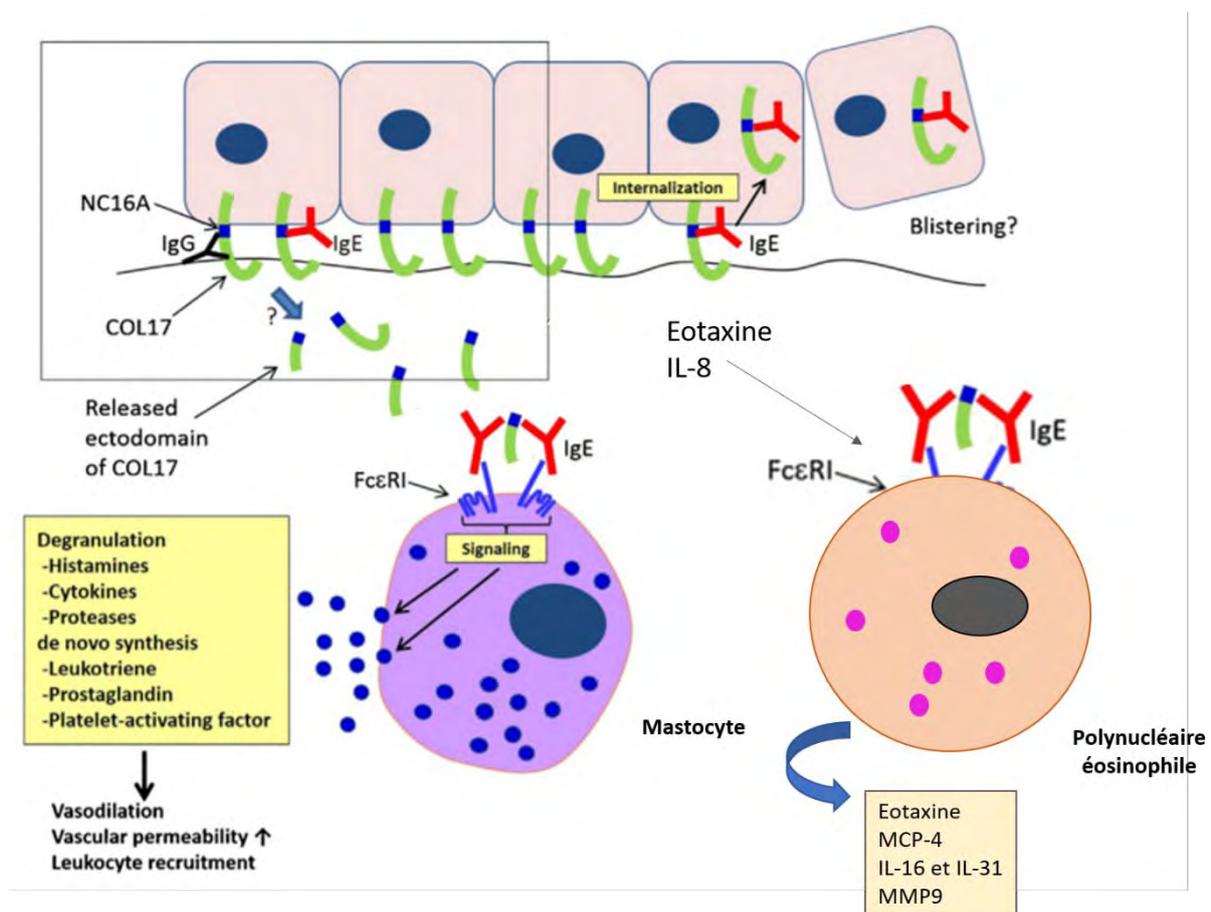


Figure 15 : Mécanismes physiopathologiques proposés pour expliquer le rôle pathogène des IgE anti-BP180 (144,149). La présence de mastocytes et de polynucléaires éosinophiles provoque la libération de médiateurs fortement pro-inflammatoires.

De nombreux auteurs ont tenté de rattacher la présentation clinique de la PB avec la présence d'IgE dirigées contre le domaine NC16A de la BP180. Kamiya et ses collaborateurs (150) rapportent un cas très détaillé où la positivité en ELISA MBL® des IgE anti-NC16A est retrouvée chez un patient présentant un phénotype atypique

urticarien. Chez ce patient, comme dans plusieurs autres séries (5,151), les titres des IgG et des IgE anti-NC16A corrôlaient avec l'intensité des symptômes et l'activité de la maladie. Les données sont toutefois très contradictoires et les résultats diffèrent selon les séries, car si certains relèvent un lien entre l'activité de la maladie et la présence d'IgE anti-BP180 (3,11,138), d'autres n'obtiennent pas de corrélation (12,140). La mise en évidence entre la présence d'IgE anti-NC16A et l'activité, la sévérité de la maladie ou la présentation clinique est résumée dans une revue (132). L'importance de ces IgE anti-NC16A n'a pas encore été définie de façon formelle, et les conclusions des différentes études ne s'accordent pas pour rattacher leur présence à un phénotype particulier.

Enfin, certaines équipes ont étudié la présence d'IgE dirigées contre la BP230 (5,137,152,153). A l'image des IgG anti-BP180, les IgE anti-BP230 sont moins bien étudiées, et leur rôle pathogène peu exploré.

Depuis quelques années, l'implication du rôle des IgE dans la PB a conduit à l'utilisation (en dehors de l'AMM) d'un traitement initialement développé pour traiter l'asthme sévère résistant : l'omalizumab. Ce médicament est un anticorps monoclonal d'isotype IgGk qui cible le domaine Cε3 des IgE circulantes (Fig 16). Cette interaction entraîne la circulation des IgE sous forme complexée avec l'anti-IgE dans la circulation sanguine, mais surtout empêche leur fixation sur les récepteurs Fcε des mastocytes, des PNB et des PNE. La demi-vie des IgE circulantes étant de 2 à 3 jours, contre plusieurs mois une fois fixés par leur fragment Fc aux cellules dans les tissus, ces IgE sont ensuite éliminées plus rapidement.

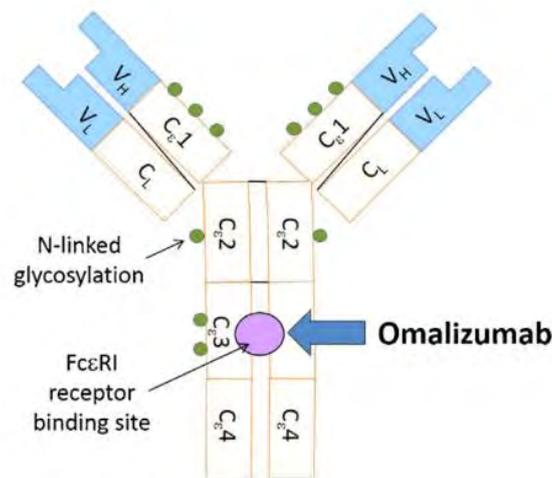


Figure 16 : Mécanisme d'action de l'omalizumab (149). La liaison de l'omalizumab au domaine Cε3 des IgE empêche la liaison des IgE au récepteur FcεI.

L'omalizumab a rencontré un certain succès thérapeutique. Le premier succès est rapporté par (13). L'omalizumab a depuis été employé chez des patients en échec thérapeutique, ou ne pouvant pas supporter une intensification thérapeutique avec des traitements immunosuppresseurs lourds. L'omalizumab a été utilisé avec succès chez

un patient réfractaire au Rituxumab (14). Une petite série rapporte également des succès thérapeutiques, sur 5 patients sur 6 traités par omalizumab (154). Sur une autre série de 11 patients traités par omalizumab, 6 réponses complètes ont été obtenues, 3 réponses partielles, et 2 échecs thérapeutiques ont été rapportés (15). Dans ces études, la présence d'IgE anti-NC16A n'a pas été recherchée chez les patients traités. Le profil de sécurité d'utilisation de ce médicament semble intéressant, d'autant plus face à des stratégies thérapeutiques fortement immunosuppressives et non dénuées de risques chez le sujet âgé. Les dermatologues envisagent cette possibilité thérapeutique, et s'appuient sur les seules données biologiques facilement disponibles et permettant d'estimer grossièrement l'efficacité de l'omalizumab : la présence d'IgE totales élevées, et le taux circulant de polynucléaires éosinophiles. Il apparaît donc nécessaire de déterminer pourquoi cette thérapeutique semble efficace, mais ne bénéficie pas à tous les patients.

F) Pemphigoïde bulleuse iatrogène

Depuis plusieurs années, certains médicaments ont été évoqués comme potentiellement déclencheurs de PB iatrogène. Parmi eux, le plus évident semble être les inhibiteurs de checkpoints du système immunitaire (anti-PD-1 pour « Programmed Death-1 » et anti-PD-L1 pour « Programmed Death Ligand-1 »), connus pour déclencher des effets indésirables inflammatoires et auto-immuns. Une classe thérapeutique de médicaments prescrits dans le diabète de type II, les gliptines (ou inhibiteurs de DPP4) sont également mis en cause dans plusieurs cohortes. D'autres cas de PB ont été rapportés après l'usage de certains traitements, tels que les diurétiques de l'anse (furosémide, bumétanide), les anti-aldostérone (spironolactone), les anti-arythmiques (amiodarone), et les neuroleptiques de la classe des phénothiazines (204). Les deux premières classes de médicaments (anti-PD-1 / anti-PD-L1 et gliptines) ont la particularité de déclencher des cas de pemphigoïdes bulleuses présentant certaines caractéristiques cliniques et biologiques : le phénotype est globalement peu sévère et moins inflammatoire d'une part, et les auto-anticorps retrouvés sont moins souvent dirigés contre le domaine NC16A de la BP180, mais plutôt contre le fragment de digestion LAD-1, par rapport aux pemphigoïdes bulleuses « classiques » non iatrogènes (99).

1) Immunothérapies anti-PD-1/L1

En cancérologie, l'utilisation des inhibiteurs de checkpoints du système immunitaire (anti-PD-1 et anti-PD-L1) s'accompagne de nombreux effets indésirables d'origine auto-immune. Ces traitements sont largement utilisés en cancérologie depuis une quinzaine d'années, principalement dans le traitement du mélanome métastatique et du cancer pulmonaire non à petites cellules. Des manifestations dermatologiques sont retrouvées chez environ 40% des patients (éruptions cutanées, prurit, vitiligo)

(155,156). 1% des patients traités développent une pemphigoïde bulleuse iatrogène. Plusieurs études ont suggéré que la physiopathologie de ces pemphigoïdes bulleuses iatrogènes pourrait différer de celle des pemphigoïdes bulleuses « classiques ». Les patients développent plus volontiers une présentation clinique atypique, et on retrouve une proportion anormalement élevée de patients ne possédant pas d'anticorps dirigés contre le domaine NC16A de la BP180. En effet, alors que classiquement 90% des patients atteints de PB ont des IgG circulantes anti-NC16A, on en retrouve seulement chez 60% des patients ayant une PB iatrogène développée sous anti-PD-1/L1 (157). En revanche, un grand nombre de ces patients possédaient des anticorps dirigés contre l'ectodomaine de la BP180 : LAD-1 (158–161). Une récente étude française de ces PB dites « immuno-induite » (diagnostiquées après la mise sous inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire) confirme ces résultats, avec un taux de positivité des IgG anti-NC16A autour de 60%, bien plus faible que dans la population de PB « classique » (162).

Quelques cas de pemphigoïde membranaire muqueuse (PMM) ont également été rapportés, à la suite d'un traitement par anti-PD1, avec la particularité d'être positifs en anti-LAD-1 (163,164). Rarement, certains patients atteints de PB « classique » n'ont pas d'anticorps dirigés ni contre la BP180 ni la BP230. Le diagnostic chez ces patients est donc posé par la clinique, l'IFI et l'IFD malgré l'absence d'auto-anticorps détectables par les tests ELISA commerciaux (165). Plusieurs études ont montré que dans ces cas il est possible de mettre en évidence des anticorps dirigés contre le fragment LAD-1 par immunoblot, particulièrement la partie C-terminale (115,116,166).

2) Gliptines (inhibiteurs de DPP4)

Plusieurs méta-analyses japonaise (167), française (168), et israélienne (169) semblent indiquer que les gliptines sont associées à un risque accru de développer une pemphigoïde bulleuse. Plusieurs cas de PB développés après l'instauration d'un traitement par inhibiteurs de DPP4 ont été étudiés (170,171), et ces patients semblent présenter des caractéristiques cliniques et biologiques particulières. Les patients traités par gliptines possèdent fréquemment des anticorps dirigés contre LAD-1 en immunoblot (24,172) et les formes cliniques développées par ces patients sous gliptines sont souvent peu inflammatoires (171). Le pourcentage de patients possédant des IgG anti-NC16A est plus faible que chez les patients atteints de PB non iatrogène : 65% seulement des patients (167), d'où l'intérêt de rechercher les anticorps dirigés contre d'autres épitopes de la BP180.

Une analyse effectuée sur 313 patients a également suggéré un lien entre le traitement par gliptines et le développement de PMM (173). Dans cette étude, les patients atteints développaient fréquemment des anticorps dirigés contre la BP180 (le fragment NC16A, la partie intermédiaire de l'ectodomaine ou le domaine C-terminal).

Une autre étude a retrouvé une proportion de patients traités par gliptines possédant des anticorps dirigés contre la BP180 entière proche de 10%, en l'absence de PB

(174). Ces données posent la question du rôle des gliptines dans l'apparition d'auto-anticorps, et le développement d'une PB. Il serait intéressant de déterminer si tous les patients qui possèdent des auto-anticorps après l'instauration du traitement sont ensuite atteints de pemphigoïde bulleuse. Dans la plupart des cas, l'arrêt de la gliptine impliquée et le traitement par corticothérapie locale suffit à l'obtention d'une réponse thérapeutique et d'un contrôle de la pathologie (168,169).

La molécule DPP4 est également connue comme le CD26, exprimé entre autres par les lymphocytes T et les kératinocytes. L'inhibition du CD26 pourrait conduire localement à un déséquilibre de la physiologie de la JDE et une rupture de tolérance envers la BP180 (175). Le blocage du CD26 exprimé sur les LyT provoque un recrutement des PNE au niveau cutané chez le rat (176), passant par l'augmentation de la sécrétion d'éotaxine, un facteur chimiotactique des éosinophiles. L'effet des inhibiteurs de DPP4 pourrait également passer par l'inhibition du clivage de la BP180 à la surface des kératinocytes, ce qui pourrait augmenter son immunogénicité (99).

Partie II : Matériels et méthodes

A) Patients

La totalité des sérums est issue de la sérothèque du secteur d'auto-immunité du laboratoire d'immunologie du CHU de Purpan (fonds de tubes, déclaration de collection DC20162804). Les sérums de patients atteints de maladies auto-immunes sont conservés plusieurs années, à -80°C . Les biopsies de peau sont congelées dès leur arrivée au laboratoire par immersion rapide dans l'azote liquide. Les biopsies sont ensuite conservées à -40°C , les coupes sont réalisées à -20°C puis après analyse des coupes, elles sont conservées pour une durée de 2 ans minimum à -80°C . Les données cliniques et biologiques issues du parcours de soin du patient ont été obtenues par les logiciels Orbis et Molis, disponibles au CHU de Toulouse, et ces données ont été traitées en respectant l'anonymat des patients.

Tous les sérums ont été analysés en ayant subi, au maximum, un seul cycle de congélation/décongélation.

B) Détection des IgE déposées sur les biopsies de patients en immunofluorescence directe

Les biopsies conservées en biothèque ont été recoupées, et incubées avec un anticorps anti-IgE couplé au FITC et dilué au 1 :10 (FI-3040 Vector Laboratories). Les coupes obtenues sont analysées au microscope à fluorescence (LEICA DM2000).

C) ELISA IgE

Les sérums sont dilués au 1 :2 dans un tampon de dilution contenant 10 mM d'EDTA. Ils sont déposés sur les puits revêtus par un tétramère du domaine NC16A, issus du kit ELISA anti-BP180 4X IgG (EA 1502-4801-2G Euroimmun®). Après lavages, l'anti-IgE couplé à la biotine (Goat anti-Human IgE (ϵ chain) - Affinity Pure, Biotin Conjugate 30-8026-M001 Tonbo®) est déposé sur les plaques au 1 :100. Après lavages, les IgE anti-BP180 sont révélées par le système Streptavidine – HRP issu du kit de détection des anticorps anti-GAD (GDE/96 Theradiag®).

D) Déplétion des IgG

Le sérum de 9 patients a été passé sur des colonnes de protéines G (Nab Protein G spin columns 89953, Thermoscientific®). Après trois passages sur la colonne, le sérum récupéré est considéré comme déplété des immunoglobulines G. Les éluats obtenus par lavages de la colonne et contenant les IgG de chaque sérum ont été conservés (Fig 17).



Figure 17 : Déplétion des IgG. Après trois passages sur des colonnes les sérums déplétés en IgG sont conservés. Les colonnes sont régénérées et les éluats sont conservés. Les IgG totales ont ensuite été dosées pour vérifier l'efficacité de la déplétion (Cobas p502, Roche®). Les IgE totales ont également été dosées (ImmunoCAP, Thermofisher®).

E) Culture cellulaire

Les kératinocytes humains de la lignée NHEK sont des kératinocytes primaires, issus de peau humaine abdominale adulte.

Les kératinocytes de la lignée NTERT sont une lignée de kératinocytes humain immortalisés par mutation du gène codant la télomérase et la perte de l'expression de p16 (177,178).

200 000 cellules sontensemencées en plaques 6 puits. Elles sont cultivées dans 2 mL de milieu permettant leur prolifération (Dermalife® K Keratinocyte Medium) pendant trois à quatre jours, à 37°C 5% CO₂. Une fois qu'elles ont atteint 90% de confluence, le milieu est changé pour 2 mL de milieu permettant leur différenciation (Epilife® additionné de calcium 1,5 mM, de Keratinocyte Growth Factor 0.01 µg/mL, d'acide ascorbique 0,286 mM, de Pénicilline 100 U/mL et de Streptomycine 100 µg/mL). Après trois jours de culture, 10µL d'inhibiteur de protéases (Protease Inhibitor Cocktail P8340, Sigma®) sont ajoutés avant récupération des 2 mL de surnageant. 50µL d'inhibiteur de protéases sont ajoutés sur les cellules avant récupération de l'extrait cellulaire (Fig 18).

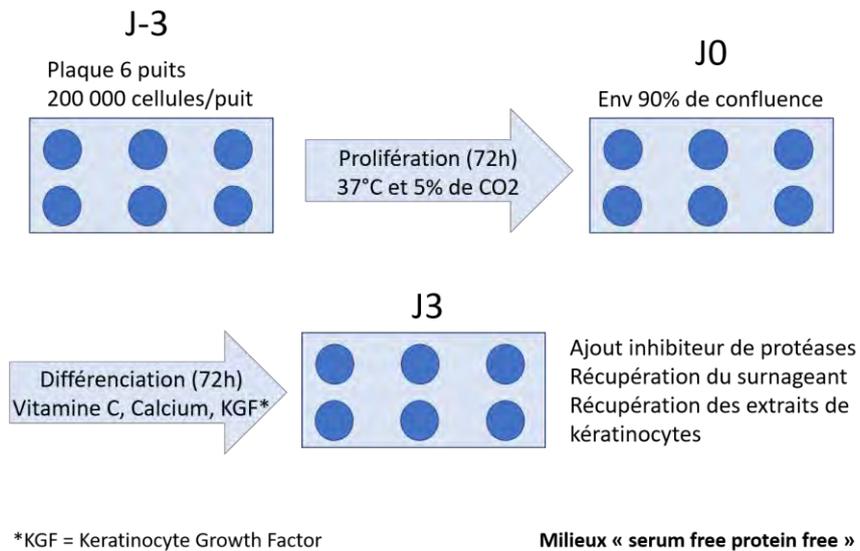


Figure 18 : Protocole culture cellulaire. Les cellules sontensemencées à raison de 200 000 cellules par puit. Après 72h de croissance à 37°C et 5% CO2 en présence de milieu Dermalife, les kératinocytes arrivent à 90% de confluence. Le milieu est changé pour du milieu Epilife, avec du KGF, du calcium et de l'acide ascorbique. Trois jours de différenciation sont nécessaires à l'expression de la BP180. Le surnageant et les extraits cellulaires sont récupérés à J3.

F) Traitement par la plasmine

Après trois jours de différenciation, les kératinocytes sont traités par la plasmine (Plasmin from human plasma, P1867, Sigma®). Des concentrations de 0,5 U/mL, 0,1 U/mL et 0,05 U/mL ont été employées, sur des durées variant de 10 minutes à cinq heures, toujours à 37°C et 5% de CO2. Une fois le temps écoulé, 100 µL d'inhibiteur sont ajoutés au surnageant, puis ce dernier est récupéré et congelé (Fig 19).

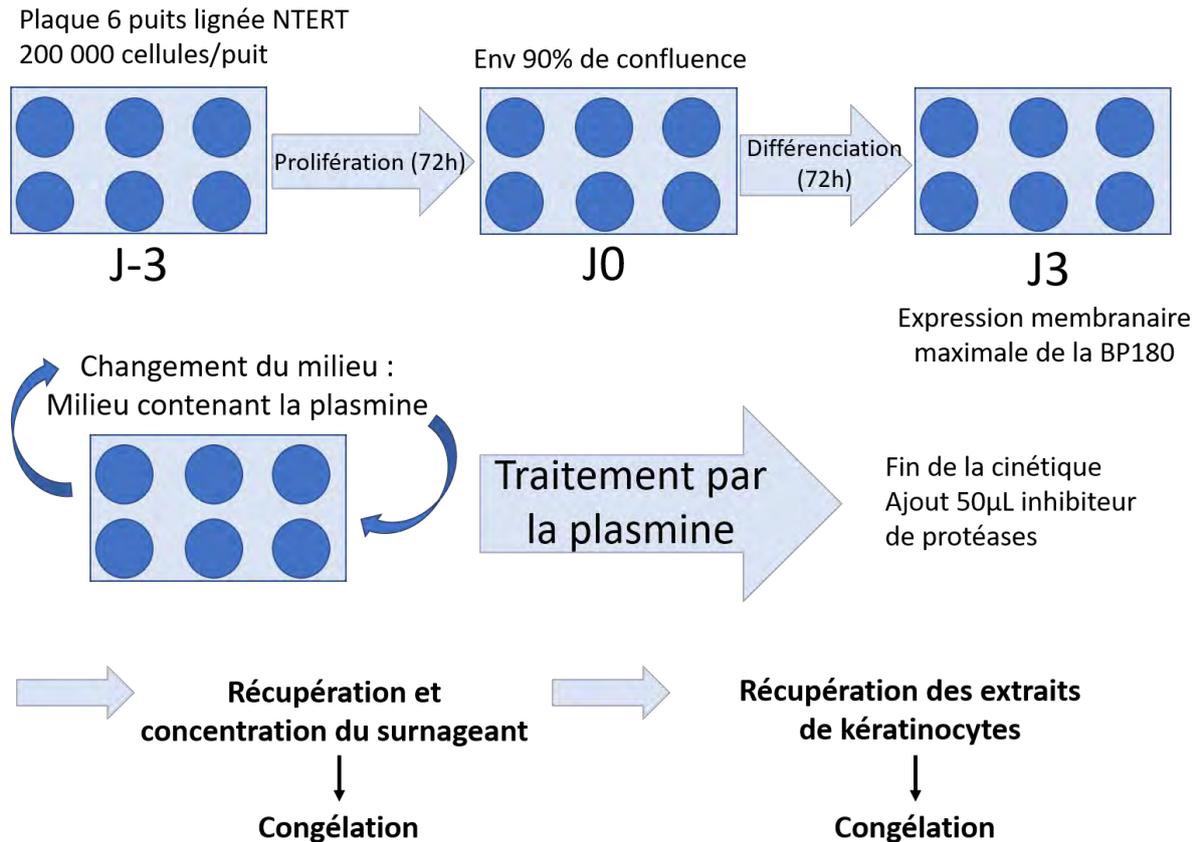


Figure 19 : Protocole du traitement par la plasmine. La culture des kératinocytes est réalisée tel que décrit dans la figure 18. Au moment de récupérer les extraits, le milieu est changé par un milieu contenant la concentration adéquate de plasmine. Les kératinocytes sont ensuite incubés le temps adéquat à 37°C. Une fois le temps écoulé, 10 µL d'inhibiteur de protéases est ajouté dans chaque puit. Le surnageant est récupéré puis concentré et congelé. Les extraits sont également récupérés et congelés.

G) Obtention des extraits cellulaires et surnageant concentré

Après récupération du surnageant de culture, 500 µL de tampon Laemmli (1,5% SDS, 2,5% bêta-mercapto-éthanol) sont ajoutés dans chaque puit. Les extraits cellulaires sont récupérés par grattage, préparés par passages successifs à 100°C puis 4°C, puis centrifugés et conservés à -20°C.

Les surnageants de culture sont poolés et concentrés à environ 12,5X à l'aide de colonnes de concentration ou « Centricon » (Vivaspin 20, Mb 30,000MWCO PES VS2021, Vivascience® Sartorius group). Du tampon Laemmli 5X est ensuite ajouté au concentré, qui est conservé à -20°C.

H) PAGE-SDS

L'électrophorèse en PAGE-SDS est réalisée avec le matériel BioRad® (Mini - PROTEAN Tetra Cell Mini Trans-Blot, BioRad), en gels 6% d'acrylamide/bis-acrylamide (Acrylamide / bis-acrylamide 30% solution A3574 Sigma®) et en conditions dénaturantes. 10µL d'extrait protéique (extrait cellulaire, ou surnageant concentré) sont déposés dans les puits du gel. La migration a lieu dans un tampon contenant 0,1% de SDS. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose, avec le matériel BioRad (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad®), dans un tampon contenant 10% de méthanol. La qualité du transfert est évaluée par coloration au rouge Ponceau (Ponceau Dye 75% 141194, Sigma®) avant incubation des membranes avec le sérum des patients. La migration est suivie grâce à un marqueur de poids moléculaire (Biobasic® BSMM0661).

I) Western blot

Les membranes sont incubées pendant la nuit à 4°C dans le sérum des patients dilué au 1 :20. Les membranes sont ensuite lavées, et incubées avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline et spécifiques des IgG humaines, dilué au 1 :2500 (Alkaline Phosphatase conjugated rabbit anti-human IgG Fcy fragment specific 309-055-008, Jackson®) ou spécifique des IgA humaines, dilué au 1 :1000 (Alkaline Phosphatase conjugated rabbit anti-human IgA α chain specific 309-055-011, Jackson®). La révélation est faite par incubation dans le substrat (BCIP/NBT Liquid Substrate B1911, Sigma®).

Pour valider la présence de la cible dans les extraits de kératinocytes et le surnageant concentré, les membranes ont été incubées avec un anticorps monoclonal de souris, spécifique de la BP180 dilué au 1 :1000 (Collagen XVII Mouse Monoclonal Antibody (NC16a-3) MBS588018 MyBiosource®). Les membranes étaient ensuite incubées avec un cocktail d'anticorps de chèvre dirigés contre les anticorps murins, et couplés à la peroxydase, dilué au 1 :10 000 (Mouse IgG-heavy and light chain cross adsorbed antibody, A90-216P Bethyl®) puis révélées grâce au système ECL Plus (Amersham ECL Prime, Cytiva®).

J) Statistiques

1) Normalisation des valeurs obtenues en milliDO :

Un patient fortement positif a été défini en tant que calibrant et dilué en série. Une valeur arbitraire a été assignée aux différentes dilutions. Pour normaliser les valeurs obtenues à chaque série, les résultats obtenus en milliDO et la valeur arbitraire étaient linéarisés : $\log(\text{milli-DO}) = f[\log(\text{UA})]$. La droite obtenue a un coefficient de

corrélation proche de 1, et les coefficients de variations du coefficient de proportionnalité (a) et de l'ordonnée à l'origine (b) ont été calculés.

2) Détermination du seuil de positivité de l'ELISA :

Le seuil a été défini à l'aide d'une série d'instructions téléchargeables sur le logiciel excel. La distribution des valeurs obtenues par analyse des sujets contrôles est normalisée selon l'algorithme Box Cox (179). Plusieurs intervalles de confiance à 90% sont ensuite proposés. Les seuils obtenus ont été comparés avec la valeur « Moyenne + 2 écarts-types » et la valeur de 30 unités arbitraires a été définie en tant que seuil de positivité.

3) Tests statistiques :

Selon les cas, plusieurs tests statistiques ont été utilisés :

- Le test de corrélation de Pearson, pour étudier la relation linéaire entre deux variables, soit la modification proportionnelle de l'une par rapport à l'autre
- Le test de corrélation de Spearman, pour étudier la variation de deux variables l'une par rapport à l'autre
- Le test non paramétrique de Fisher, pour étudier le lien entre deux variables

Partie III : Résultats

A) Mise au point d'une technique de Western blot : Détection des auto-anticorps ciblant des épitopes non détectables par les tests commerciaux

1) Analyse des profils sur extraits de kératinocytes humains

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil de réactivité de patients atteints de plusieurs dermatoses bulleuses auto-immunes, bien caractérisés sur le plan clinique et biologique. Ces patients étaient des patients atteints de pemphigoïde bulleuse, de pemphigus, de dermatose linéaire à IgA, ou bien des patients contrôles (sans pathologie auto-immune connue). Au total, 16 patients ont permis l'étude des profils obtenus par les extraits de kératinocytes. Après migration des protéines extraites de kératinocytes humains (lignée NTERT), les sérums des patients ont révélé plusieurs profils (cf Fig 20).

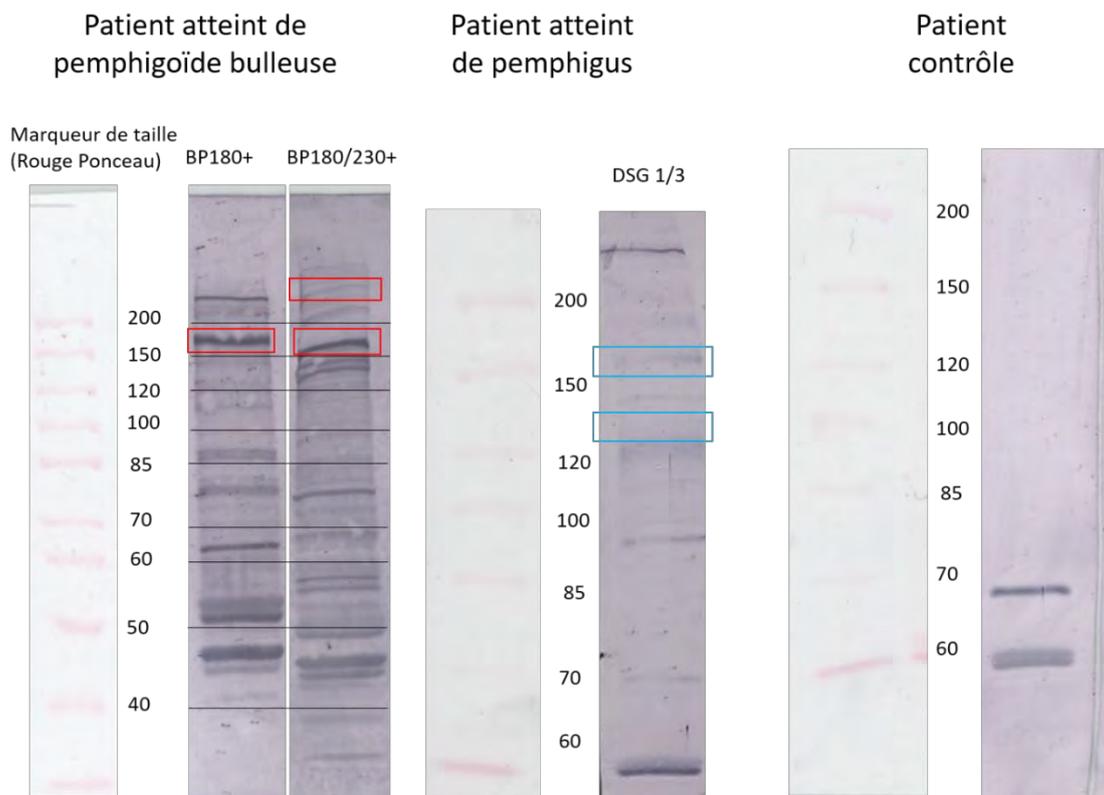


Figure 20 : Westerns blot, résultats obtenus pour des patients atteints de pemphigoïde bulleuse, de pemphigus ou de patients contrôles : exemples de résultats obtenus. L'extrait est issu de kératinocytes NTERT, après trois jours de différenciation. Après dépôt de 10 μ L d'extrait et migration, incubation de la membrane par le sérum du patient puis révélation par une anti-IgG couplée à la phosphatase alcaline. Les poids moléculaires indiqués grâce au marqueur de taille sont notés en kDa.

A l'aide des poids moléculaires connus de protéines exprimées par les kératinocytes (83,180) et des poids moléculaires apparents des bandes révélées, nous avons construit le tableau suivant (cf Table 2).

PM migration (kDa)	Nom protéine	Cible antigénique dans la/les pathologie(s) suivante(s)	Fonction protéine
250	Desmoplakine I	Pemphigus paranéoplasique	Constituant du desmosome
230	BP230	Pemphigoïde bulleuse	Constituant de l'hémidesmosome
210	Desmoplakine II Envoplakine	Pemphigus paranéoplasique	Constituant du desmosome
200	S.U. β -4-intégrine S.U. α -3 laminine 5	ND Pemphigoïde cicatricielle	Filament d'ancrage (hémidesmosome)
180	BP180	Pemphigoïde bulleuse	Constituant de l'hémidesmosome
175	?	NA	NA
160	DSG1	Pemphigus	Constituant du desmosome
150	DSG2	ND	Constituant du desmosome
145	?	NA	NA
140	Nuclear lamin S.U. β -3 laminine 5	ND Pemphigoïde cicatricielle	NA Filaments d'ancrage
130	DSG3 ou S.U. uncéine	Pemphigus ND	Constituant du desmosome Filament d'ancrage
120	LAD-1 Desmocolline I Involucrine	Pemphigoïde bulleuse et dermatose linéaire à IgA Pemphigus à IgA ND	Produit de clivage de la BP180 Constituant du desmosome Durcissement de la membrane plasmique
110	Desmocolline II	Pemphigus à IgA	Constituant du desmosome
100	S.U. uncéine	ND	Filament d'ancrage (hémidesmosome)
95	LABD97	Dermatose linéaire à IgA	Produit de clivage de la BP180
90	?	NA	NA
85	?	NA	NA
80	?	NA	NA
75	?	NA	NA
70	?	NA	NA
65	?	ND	NA
60	Filaggrine	ND	Participe à agrégation kératine
58	PNPLA1 (patatin-like phospholipase domain-containing 1)	ND	Activité lipolytique et acétyltransférase

Tableau 2 : Poids moléculaires et protéines associées ; NA : non applicable ; ND : non défini ; ? : Pas de protéine de kératinocyte migrant spécifiquement à ce poids moléculaire. Les cibles de la PB sont indiquées en vert, celles du pemphigus en gris, celles de la pemphigoïde cicatricielle en bleu, du pemphigus paranéoplasique en jaune. Les protéines d'intérêt, LAD-1 et LABD97 sont mises en évidence en orange.

Les protéines contenues dans les extraits de kératinocytes NTERT obtenus après 3 jours de différenciation ont été analysées par Western blot. Le sérum de trois patients contrôle (exempts de maladie auto-immune), sept patients atteints de pemphigoïde bulleuse, trois patients atteints de dermatose linéaire à IgA, et trois patients atteints de pemphigus ont été analysé. Nous avons obtenu les résultats suivants :

(1) Nous avons confirmé que les extraits obtenus avec la lignée de kératinocytes NTERT permettaient d'obtenir des bandes aux poids moléculaires attendus. En effet, chez les patients ayant des auto-anticorps dirigés contre la BP180 et la BP230, les sérums révèlent des protéines migrant à 180 kDa et à 230 kDa. Il en est de même pour les patients qui souffrent de pemphigus, et ont des anticorps dirigés contre les DSG1 et DSG3 : leurs sérums révèlent des bandes à 130 kDa et 160 kDa. Enfin, les sérums de patient n'ayant pas d'auto-anticorps détecté au laboratoire d'auto-immunité, et notamment aucun anticorps impliqué dans les DBAI, ne révélaient aucune bande à ces poids moléculaires.

(2) Des bandes révélant des anticorps dirigés contre des protéines non identifiées ont été mises en évidence, et sont résumées dans le tableau suivant (Table 3) :

PM migration (kDa)	Nom protéine	Cible antigénique dans la pathologie suivante	n = 3	n = 7	n = 3	n = 3	N = 16
			Contrôles	PB	DIGAL	Pemphigus	Tous
250	Desmoplakine I	Pemphigus paranéoplasique	1/3	1/7	0/3	1/3	3 (19%)
230	BP230	Pemphigoïde bulleuse	0/3	4/7	0/3	0/3	4 (25%)
210	Desmoplakine II	Pemphigus paranéoplasique	0/3	2/7	2/3	1/3	5 (31%)
200	S.U. bêta-4-intégrine	ND	1/3	3/7	0/3	1/3	5 (31%)
180	BP180	Pemphigoïde bulleuse	0/3	6/7	0/3	0/3	6 (38%)
175	?	NA	3/3	4/7	2/3	2/3	11 (69%)
160	DSG1	Pemphigus	0/3	1/7	2/3	1/3	4 (25%)
150	DSG2	ND	1/3	4/7	2/3	1/3	8 (50%)
145	?	NA	1/3	1/7	0/3	1/3	3 (19%)
140	Nuclear lamin	ND	0/3	2/7	1/3	0/3	3 (19%)
130	DSG3 ou S.U. uncéine	Pemphigus	1/3	4/7	2/3	3/3	10 (62%)
120	LAD-1 ou involucrine	Pemphigoïde bulleuse et dermatose linéaire à IgA	0/3	5/7	1/3	1/3	7 (44%)
110	?	NA	0/3	4/7	2/3	2/3	8 (50%)
107	Desmocolline II	ND	0/3	2/7	1/3	0/3	3 (19%)
100	S.U. uncéine	ND	2/3	4/7	0/3	2/3	8 (50%)
95	LABD97	Dermatose linéaire à IgA	1/3	4/7	3/3	3/3	11 (69%)
90	?	NA	1/3	3/7	0/3	1/3	5 (31%)
85	?	NA	1/3	5/7	1/3	1/3	8 (50%)
80	?	NA	1/3	5/7	2/3	1/3	9 (56%)
75	?	NA	0/3	3/7	2/3	2/3	7 (44%)
70	?	NA	3/3	5/7	2/3	2/3	12 (75%)
65	?	ND	0/3	3/7	0/3	2/3	5 (31%)
60	Filaggrine	ND	3/3	6/7	2/3	2/3	13 (81%)
58	PNPLA1	ND	2/3	5/7	2/3	3/3	12 (75%)

Tableau 3 : Bandes révélées chez les patients analysés sur extraits totaux de kératinocytes humains ; NA : non applicable ; ND : non défini ; ? : Pas de protéine de kératinocyte migrant spécifiquement à ce poids moléculaire.

Les résultats obtenus montrent que, même si l'on retrouve les bandes aux poids moléculaires attendus chez la plupart des patients, l'extrait de kératinocytes contient un grand nombre de protéines, et certaines bandes sont retrouvées chez tous les groupes de patients. Ainsi ces bandes sont considérées comme non discriminantes et non pertinentes. Par ailleurs, les cibles d'intérêt (LAD-1 et LABD97) migrant à 120 kDa et 97 kDa ne sont probablement pas les seules protéines révélées migrant à ces poids moléculaires : cela est le cas de l'involucrine, une protéine synthétisée par les kératinocytes et migrant au même poids moléculaire que LAD-1.

Nous avons donc optimisé la technique afin d'obtenir une source antigénique contenant moins de protéines, et enrichie en LAD-1 et LABD97, les fragments de clivage de la BP180.

2) Obtention de surnageants enrichis LAD-1 et LABD97

Nous nous sommes basés sur des résultats précédemment publiés dans plusieurs articles (22,60,181,182), décrivant la présence de fragments de clivage de la BP180 dans le surnageant de culture de kératinocytes cultivés *in vitro*. Nous avons comparé la quantité de protéines d'intérêts obtenues dans le surnageant de culture à partir d'une lignée primaire de kératinocytes humains NHEK et d'une lignée immortalisée, NTERT. C'est cette dernière qui contenait le plus de produit de clivage dans le surnageant, à J3 (données non montrées ici), nécessitant malgré tout une concentration du surnageant pour obtenir une quantité suffisante de protéines, nécessaire à la visualisation des bandes (données non montrées ici).

Après obtention des extraits cellulaires et des surnageants concentrés, nous avons vérifié la présence de la BP180 et de son produit de clivage LAD-1 dans l'extrait et dans le surnageant de culture, avec un anticorps monoclonal anti-BP180 murin capable de reconnaître indifféremment la BP180 et les fragments LAD-1 et LABD97 (Fig 21).

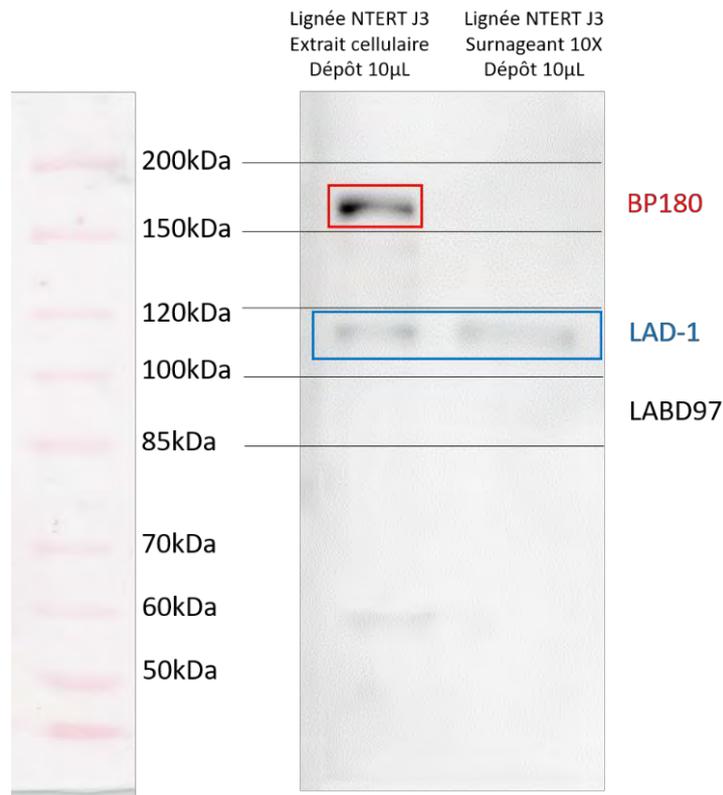


Figure 21 : Les extraits de kératinocytes contiennent la BP180, les extraits et le surnageant concentré contiennent son produit de clivage LAD-1. Les extraits et le surnageant concentré de kératinocytes NTERT, après trois jours de différenciation, ont migré en PAGE-SDS puis ont été incubés avec un anticorps monoclonal murin spécifique de la BP180. La révélation est effectuée par chimioluminescence après incubation avec un anticorps de lapin anti-souris couplé à la HRP, puis avec le substrat de l'enzyme.

La bande à 180 kDa est bien la BP180, reconnue par l'anticorps monoclonal spécifiques du domaine NC16A (1-3) de la BP180. L'extrait, mais surtout le surnageant concentré, contiennent le fragment de clivage migrant à 120 kDa (LAD-1). En revanche, ni l'un ni l'autre ne contient le fragment de clivage migrant à 97 kDa (LABD97).

Pour enrichir le surnageant en produits de clivage, nous avons traité les kératinocytes par la plasmine. Après migration et transfert, nous avons révélé les membranes avec le sérum d'un patient possédant des anticorps anti-BP180 (Fig 22 et 23) ou avec l'anticorps monoclonal anti-BP180 (Fig 24).

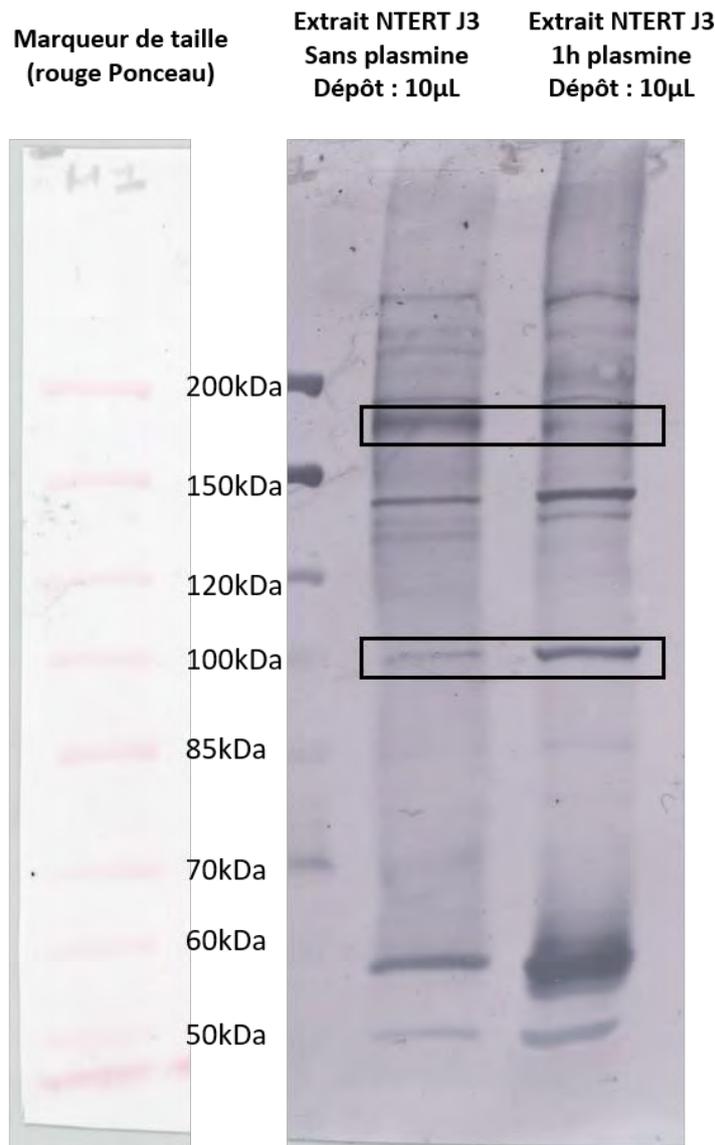


Figure 22 : La plasmine dégrade la BP180 (cadre noir, en haut) et fait apparaître une bande à environ 100 kDa (cadre noir, en bas) dans l'extrait de kératinocyte. Les kératinocytes NTERT sont traités, ou non, par la plasmine pendant une heure. La digestion enzymatique génère des fragments de digestion, dont ceux de la BP180. Les membranes sont incubées avec le sérum d'un patient possédant des anticorps anti-BP180, puis révélées par une anti-IgG couplée à la phosphatase alcaline.

Après action de la plasmine, on observe une diminution importante de l'intensité de la bande à 180 kDa, et une augmentation d'un fragment migrant à environ 100 kDa. Ce résultat suggère que la protéine migrant à 180kDa est bien la BP180, et que le traitement par la plasmine entraîne le clivage de l'ectodomaine. La bande correspondant à la BP180 voit son intensité diminuer, et l'on voit apparaître une bande migrant en dessous de 100 kDa. Ce fragment pourrait être la partie intracellulaire et transmembranaire de la BP180 restant à la membrane une fois la digestion enzymatique effectuée. Pour visualiser le fragment de clivage libéré dans le milieu de culture puisque n'étant plus relié à la membrane cellulaire, il est nécessaire d'étudier le surnageant de culture des kératinocytes après digestion enzymatique par la plasmine.

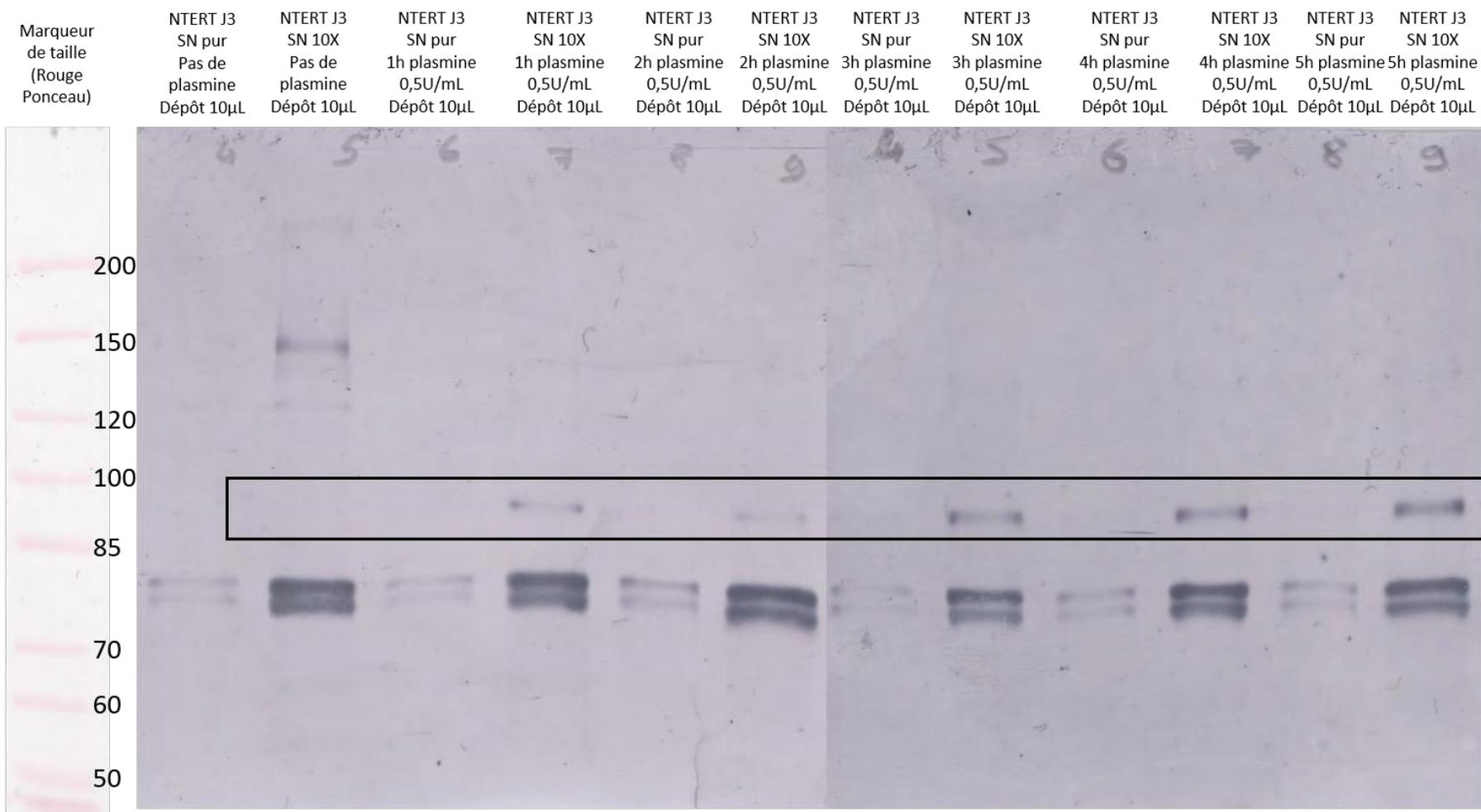


Figure 23 : Le surnageant concentré contient le fragment de digestion de la BP180 migrant légèrement en dessous de 100 kDa. L'augmentation du temps de digestion enzymatique se traduit par une augmentation de la libération du fragment migrant à environ 95 kDa. Le surnageant pur ne contient pas assez de fragment de digestion pour être révélé par le sérum du patient. Les kératinocytes sont traités par la plasmine pour réaliser une digestion enzymatique de la BP180. Le surnageant est déposé pur ou concentré, puis après migration, incubation avec le sérum d'un patient possédant des anti-BP180 et révélation par une anti-IgG. SN = surnageant. 10X = concentré 10 fois.

L'analyse du surnageant de culture après le traitement par la plasmine révèle l'apparition d'un produit de clivage, migrant légèrement en dessous du marqueur de taille 100 kDa. Ce produit de clivage n'est visible que lorsque le surnageant est concentré. Plus le temps de traitement par la plasmine est important, plus cette bande est révélée de façon intense (Fig 23). Nous avons vérifié que ce fragment est bien un produit de clivage de la BP180, grâce à l'anticorps monoclonal anti-BP180 (Fig 24).

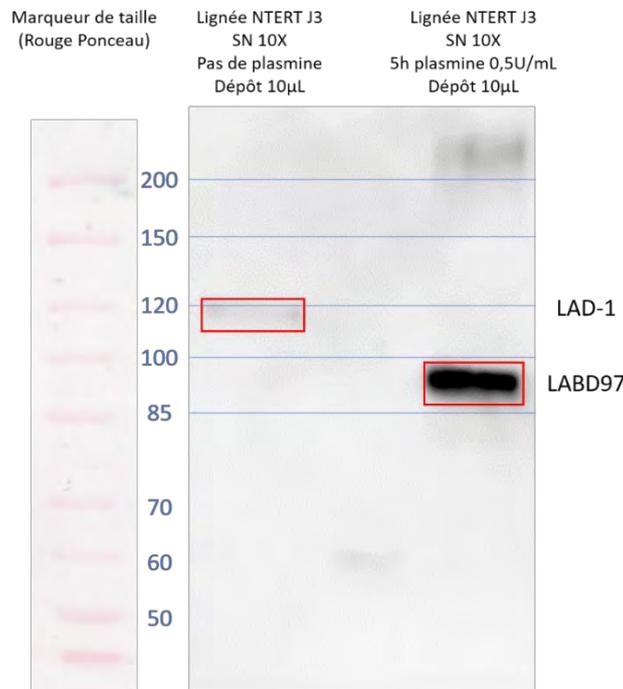


Figure 24 : Le surnageant (SN) traité par la plasmine est fortement enrichi en produit de clivage de la BP180 migrant en dessous de 100 kDa. Ce fragment est reconnu par l'anticorps monoclonal anti-BP180.

La bande migrant à 120 kDa en absence de traitement par la plasmine est reconnue par l'anticorps monoclonal anti-BP180 indiquant que cette protéine est l'ectodomaine de la BP180, LAD-1. De même, le produit de la digestion par la plasmine migrant à environ 100 kDa est également reconnu par l'anticorps monoclonal. Ce fragment correspond probablement au fragment LABD97. Sa présence en grandes quantités lors du traitement des kératinocytes par la plasmine indique qu'une part importante de la BP180 exprimée à la membrane est clivée, et que le surnageant de culture se retrouve fortement enrichi en produit de clivage. En revanche, la totalité des produits de clivage est dégradée en fragment d'environ 100 kDa : il ne reste plus aucune trace de la forme LAD-1 migrant à 120 kDa. Les quantités de LAD-1 retrouvées dans le surnageant en absence de traitement par la plasmine sont relativement faibles, et donnent un marquage de faible intensité. La dernière étape du développement de cette technique de Western blot était donc d'optimiser le protocole de traitement par la plasmine pour obtenir un surnageant concentré contenant à la fois du LAD-1 (à 120 kDa) et du LABD97 (à environ 100 kDa). En incubant les kératinocytes pendant plusieurs points cinétiques, et en utilisant plusieurs concentrations de plasmine, nous avons déterminé la condition optimale pour obtenir les deux produits de clivage de la BP180 (Fig 25).

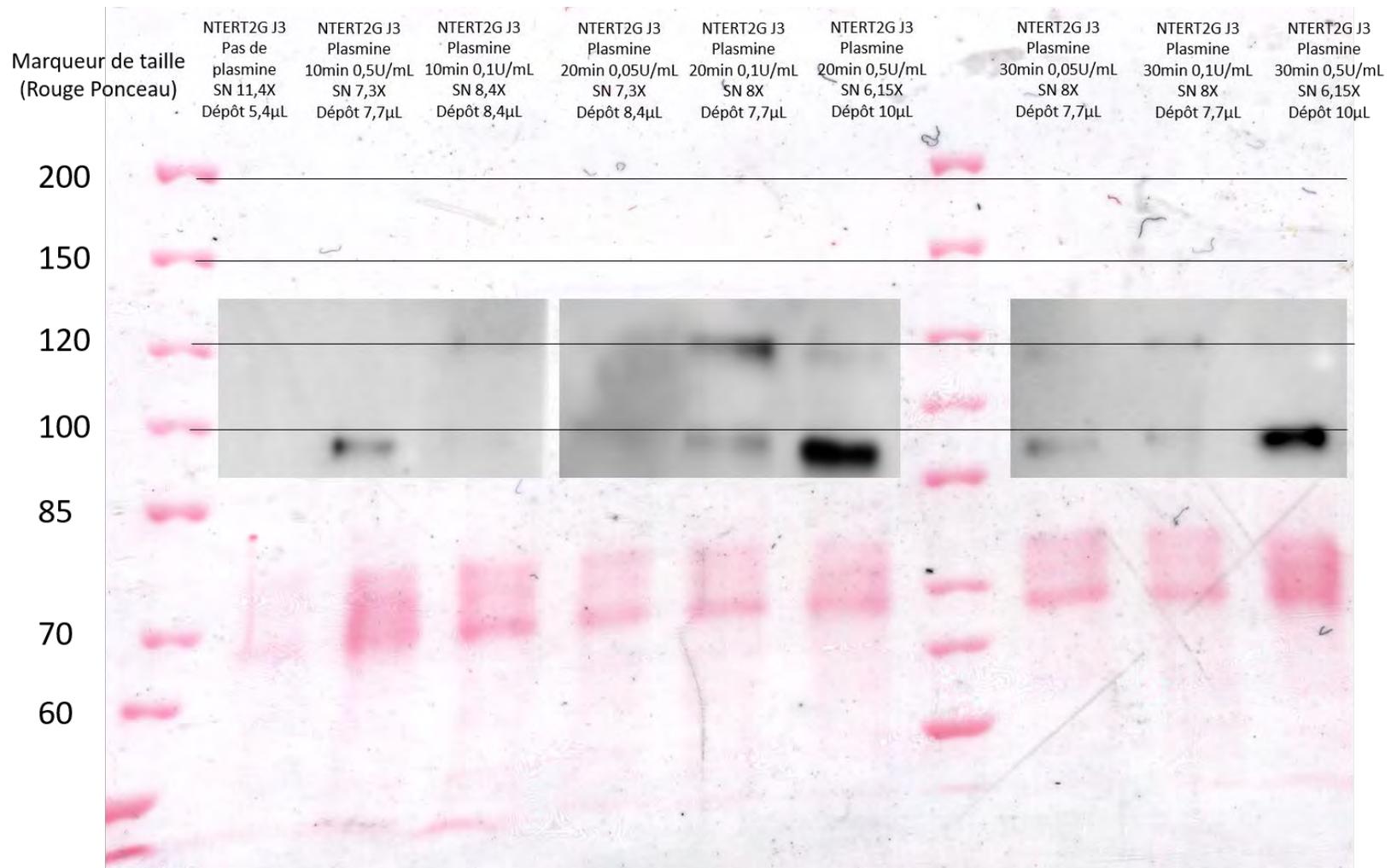


Figure 25 : L'incubation des kératinocytes avec 0,1 U/mL de plasmine pendant 20 minutes permet l'obtention d'un surnageant contenant les deux fragments de clivage de la BP180 : LAD-1 et LABD97. Sur cette figure est représentée la membrane colorée après incubation dans du rouge Ponceau, et en superposition aux positions adéquates les bandes révélées par l'anticorps monoclonal spécifique de la BP180.

Finalement, les prochaines analyses réalisées au laboratoire d'auto-immunité seront effectuées avec un **surnageant obtenu après traitement 20 minutes par la plasmine à 0,1 U/mL**. Cette source antigénique permettra d'étudier la réactivité d'un même sérum vis-à-vis des deux produits de clivage de la BP180 dans les populations d'intérêt.

3) Comparaison des profils obtenus sur surnageant concentré avec le sérum de patients atteints de pemphigoïde bulleuse immuno-induite :

Nous avons recherché la présence d'anticorps dirigés contre LAD-1 dans le sérum de 11 patients traités par anti-PD-1 ou anti-PD-L1 et chez qui le diagnostic de pemphigoïde bulleuse avait été retenu. Nous avons également analysé les sérums de trois populations témoins : des contrôles sains de l'EFS (n=11), des patients atteints de pemphigoïde bulleuse en l'absence de tout traitement par anti-PD-1 (n=11), et des patients traités par anti-PD-1 mais n'ayant pas développé de pemphigoïde bulleuse (n=11). Les données clinico-biologiques des patients sont présentées dans le tableau 4. Les figures 26 et 27 montrent les membranes de nitrocellulose révélées par les sérums des patients atteints de PB après traitement par anti-PD-1 ou anti-PD-L1, et par les sérums des contrôles sains de l'EFS.

Chez les **contrôles sains de l'EFS**, **un seul sérum** (soit 9%) révèle une discrète bande migrant à 120 kDa. Pour exclure la présence d'une réactivité dirigée contre LAD-1, le sérum de cet individu a été analysé en IFI sur peau clivée et en ELISA anti-NC16A IgG. Aucune fluorescence ne marque la membrane basale dermo-épidermique pour cet individu, et le sérum ne contient pas d'IgG anti-NC16A par test ELISA.

Pour les **patients atteints de pemphigoïde bulleuse**, **seuls deux sérums de patients** (soit 18%) reconnaissent une bande migrant à 120 kDa.

Pour les **patients traités par anti-PD-1** mais sans suspicion clinique de pemphigoïde bulleuse, **trois patients** (27%) possèdent des anticorps capables de reconnaître une protéine migrant à 120 kDa. Pour deux d'entre eux, aucun autre test n'est positif (ELISA BP180, BP230, IFI en peau clivée). En revanche, un patient possède des anticorps se fixant sur le versant épidermique le long de la JDE. Au moment de cette analyse, ce patient ne présente pas de clinique évocatrice d'une pemphigoïde bulleuse.

Chez les **patients pour qui le diagnostic de pemphigoïde bulleuse a été posé après l'introduction d'inhibiteurs de checkpoint du système immunitaire** (anti-PD-1 ou anti-PD-L1), les informations biologiques sont les suivantes :

- Aucun de ces patients n'étaient positifs en ELISA BP230 IgG.
- Sept patients étaient positifs en ELISA IgG anti-NC16A et en IFI sur œsophage de singe.

- Sur les quatre patients négatifs en ELISA IgG anti-NC16A, deux étaient positifs en IFI, et deux n'ont montré de positivité qu'avec l'analyse de la biopsie de peau en IFD

Après analyse des résultats du Western blot concernant ces patients :

- Huit patients (73%) parmi les onze testés présentent une réactivité contre une bande migrant à 120 kDa (Fig 27).
- Pour cinq d'entre eux, la présence d'anticorps anti-BP180 IgG, ainsi qu'une positivité en IFI sur œsophage de singe, avaient été objectivées.
- Concernant les patients négatifs en IgG anti-BP180, deux d'entre eux étaient positifs en IFI sur œsophage de singe, et on retrouve également une fluorescence sur le versant épidermique de la peau clivée en IFI.
- Pour le dernier patient, le seul argument en faveur d'une pemphigoïde bulleuse était la présence de deux biopsies positives en IFD à deux reprises.

Patients PB sous anti-PD1	Âge	Sexe	Titre anti-BP180 (UA)	Titre anti-BP230 (UA)	Positivité en IFI peau clivée	Positivité en IFI œsophage de singe	Positivité en blot
1	48	M	130	<2	Positif (ve)	Positif	Négatif
2	83	M	150	<2	Négatif	Positif	Positif
3	76	M	8	<2	Positif (ve)	Positif	Positif
4	86	F	<2	<2	NF	Négatif	Négatif
5	70	M	134	<2	NF	Positif	Négatif
6	53	M	110	<2	Positif (atypique)	Positif	Positif
7	80	M	<2	<2	Négatif	Négatif	Positif
8	73	M	>200	<2	Positif (ve)	Positif	Positif
9	73	M	145	<2	Positif (ve)	Positif	Positif
10	83	M	51	<2	Négatif	Positif	Positif
11	76	M	<2	<2	Positif (ve)	Positif	Positif
Contrôles EFS	Âge	Sexe	Titre anti-BP180 (UA)	Titre anti-BP230 (UA)	Positivité en IFI peau clivée	Positivité en IFI œsophage de singe	Positivité en blot
1	58	F	11	NF	Négatif	NF	Négatif
2	51	F	<2	NF	Négatif	NF	Négatif
3	51	M	<2	NF	Négatif	NF	Négatif
4	22	M	4	NF	Négatif	NF	Négatif
5	54	M	<2	NF	Négatif	NF	Négatif
6	31	M	2	NF	Négatif	NF	Négatif
7	33	F	<2	NF	Négatif	NF	Négatif
8	22	F	<2	NF	Négatif	NF	Négatif
9	22	F	3	NF	Positif faible (ve)	NF	Négatif
10	29	F	2	NF	Négatif	NF	Positif
11	42	M	2	NF	Positif (ve)	NF	Négatif

Patients sous anti-PD-1	Âge	Sexe	Titre anti-BP180 (UA)	Titre anti-BP230 (UA)	Positivité en IFI peau clivée	Positivité en IFI œsophage de singe	Positivité en blot
1	72	M	<2	<2	Positif (ve et vd)	Négatif	Négatif
2	53	F	<2	<2	Négatif	Négatif	Négatif
3	72	F	<2	<2	Négatif	Négatif	Négatif
4	58	M	<2	<2	Négatif	NF	Positif
5	78	M	<2	<2	NF	Positif	Négatif
6	37	F	<2	<2	N	Négatif	Positif
7	69	F	<2	<2	Positif (ve)	Négatif	Positif
8	68	M	<2	<2	NF	Négatif	Négatif
9	83	M	<2	<2	NF	Négatif	Négatif
10	62	M	<2	<2	NF	Négatif	Négatif
11	58	M	<2	<2	NF	Négatif	Négatif
Patients PB	Âge	Sexe	Titre anti-BP180 (UA)	Titre anti-BP230 (UA)	Positivité en IFI peau clivée	Positivité en IFI œsophage de singe	Positivité en blot
1	85	M	>200	<2	Négatif	Positif	Négatif
2	78	F	189	<2	Négatif	Positif	Négatif
3	71	F	107	<2	Négatif	Positif	Négatif
4	91	F	161	163	Négatif	Positif	Négatif
5	75	M	<2	<2	Positif (ve et vd)	Positif	Négatif
6	86	M	>200	<2	Négatif	Positif	Négatif
7	87	M	170	147	NF	Positif	Négatif
8	94	F	>200	<2	Positif (ve)	Positif	Négatif
9	79	M	2	13	Négatif	Positif	Positif
10	71	F	176	<2	NF	Positif	Positif
11	92	M	>200	>200	Positif faible (ve)	NF	Négatif

Tableau 4 : Résumé des informations biologiques concernant les individus testés en immunoblot. PB : pemphigoïde bulleuse. M : masculin. F : féminin. ve : versant épidermique. vd : versant dermique. En vert les patients atteints de PB après traitement par anti-PD-1 ou anti-PD-L1. En jaune les contrôles sains. En gris les patients traités par anti-PD-1. En bleu les patients atteints de PB. Les nuances de couleur indiquent les patients positifs en Western blot pour la bande migrant à 120 kDa.

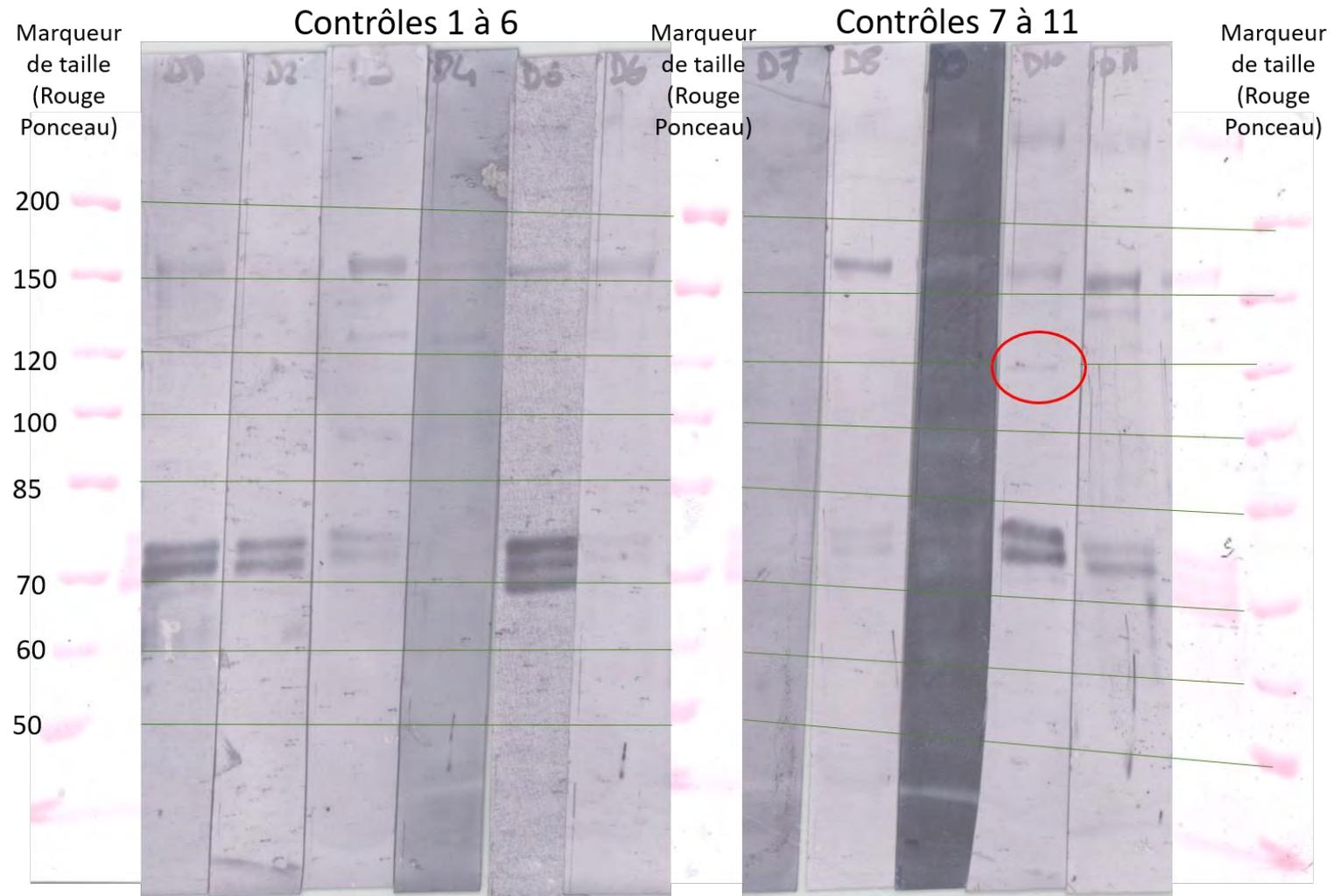


Figure 26 : Seul un contrôle sain reconnaît une bande à 120kDa. Dépôt : 10 μ L de surnageant concentré après 3 jours de culture *in vitro* de kératinocytes en milieu de différenciation.

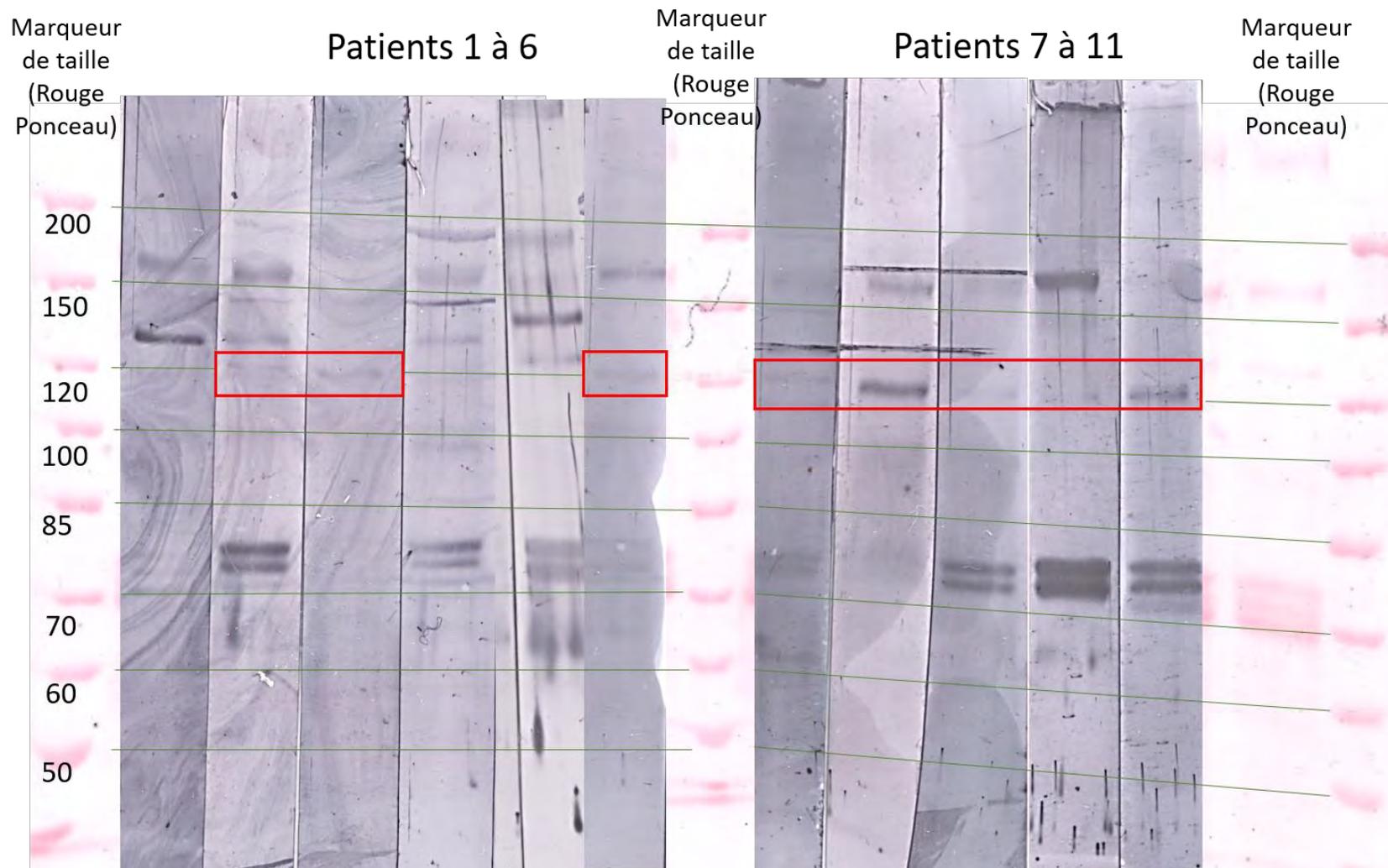


Figure 27 : Huit patients traités par anti-PD1 et développant une pemphigoïde bulleuse reconnaissent une bande à 120kDa. Dépôt : 10 μ L de surnageant concentré après 3 jours de culture *in vitro* de kératinocytes en milieu de différenciation.

On note que la plupart des sérums reconnaissent une bande migrant approximativement à 160 kDa, et un doublet ou un triplet de bandes migrant entre 70 et 75 kDa. Aucune protéine exprimée spécifiquement par les kératinocytes ne migre à ce poids moléculaire.

La population de patients qui reconnaît majoritairement la protéine LAD-1 est bien celle d'intérêt : les patients atteints de pemphigoïde bulleuse après instauration d'un traitement par anti-PD-1. Dans cette population, l'analyse des sérums a permis d'identifier la cible reconnue par les auto-anticorps circulants, en l'absence de positivité des deux tests ELISA commerciaux disponibles chez trois patients. En ce qui concerne les patients traités par anti-PD-1, seul le suivi pourra permettre d'évaluer si l'apparition d'anticorps anti-LAD-1 est provoquée par l'utilisation des anti-PD-1 seuls, ou si ces auto-anticorps précèdent l'apparition d'une pemphigoïde bulleuse.

4) Comparaison des profils obtenus sur surnageant après traitement par la plasmine puis concentré avec le sérum de patients atteints de DIGAL :

De même, nous avons recherché la présence d'anticorps dirigés contre le produit de clivage LABD97 chez des patients pour lesquels le diagnostic retenu était une suspicion de dermatose linéaire à IgA. La dermatose linéaire à IgA est une pathologie rarissime, de diagnostic essentiellement clinique, où la seule preuve biologique est un dépôt d'IgA le long de la jonction dermo-épidermique en IFD. A l'exception des techniques d'identification en Western blot, il n'existe pas d'autre test biologique de routine permettant de poser le diagnostic.

Les informations biologiques des 8 patients testés pour la reconnaissance de LAD-1 sont résumées dans le tableau 5. Les sérums ont été incubés après migration de surnageant concentré de kératinocytes traités par la plasmine pendant 4h. 8 sérums de contrôles sains ont été analysés avec le même extrait contenant LABD97 (Fig 28). La sélection des 8 patients étudiées (Fig 29) a été basée sur des arguments cliniques, mais également sur la positivité de 7 biopsies sur 8 en IgA, et de cinq sérums testés en IFI sur peau clivée et révélation par une anti-IgA. Le diagnostic de DIGAL avait été retenu essentiellement sur les données cliniques et sur les résultats de l'IFD.

Numéro patient	Sexe	Age	Membrane IgG	Peau clivée IgG	Peau clivée IgA	Biopsie	BP180	BP230	DSG1	DSG3	Résultat blot
1	M	83	Négatif	Positif (ve)	Positif (ve)	Positif en IgG, IgA, complément	<2	<2	<2	<2	Négatif
2	M	41	Positif	Négatif	Positif (ve)	Positif en IgA et complément	<2	4	<2	<2	Négatif
3	M	72	Négatif	Négatif	Positif (ve)	Positif en IgA	<2	<2			Négatif
4	M	58	Négatif	NF	Négatif	Positif en IgA	<2	<2			Négatif
5	F	59	Négatif	Négatif	Positif (ve)	Positif en IgA	<2	<2	<2	<2	Positif
6	F	67	Négatif	NF	Négatif	NF	<2	<2	<2	<2	Négatif
7	M	19	Positif	Négatif	Négatif	Positif en IgG, IgA, complément	6	5	9	2	Négatif
8	F	27	Négatif	NF	Positif	Positif en IgA et complément	<2	<2	<2	<2	Négatif

Tableau 5 : Données biologiques des patients testés en immunoblot pour LABD97 ; M = masculin ; F = féminin ; P = positif ; N = négatif ; ve = versant épidermique

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 28 et 29.

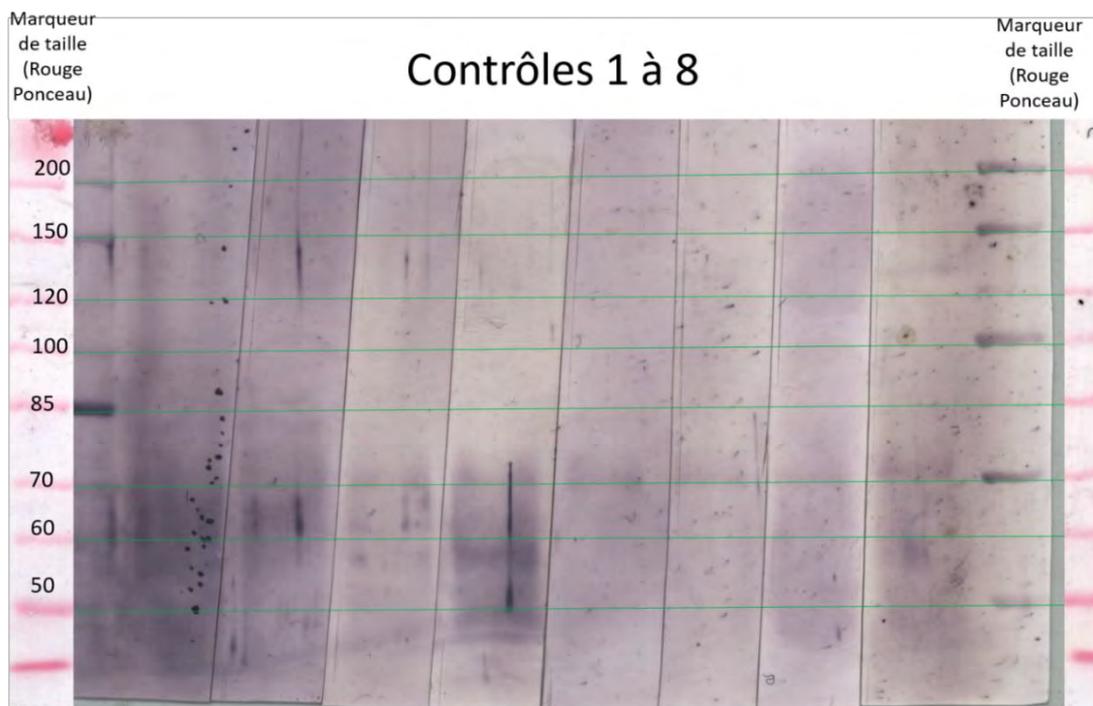


Figure 28 : Aucune bande proche de 100 kDa n'est reconnue chez les contrôles de l'EFS. Dépôt : 10 μ L de surnageant concentré après 3 jours de culture *in vitro* de kératinocytes en milieu de différenciation puis traitement par la plasmine (0,5U/mL pendant 4 heures).

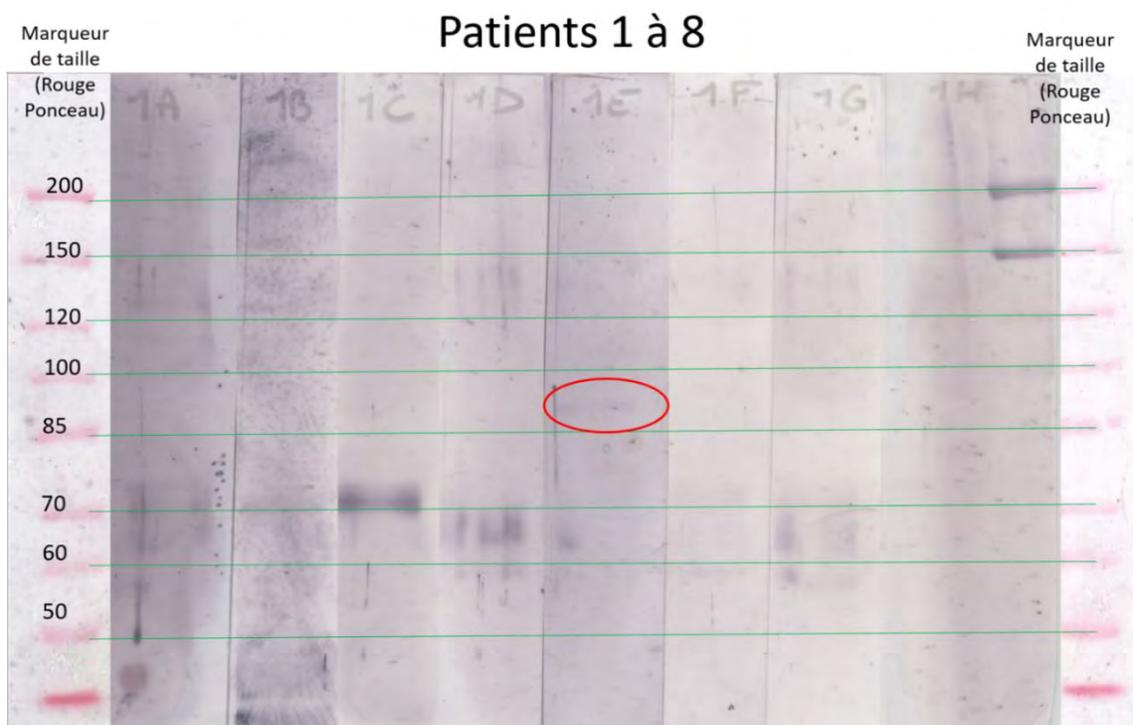


Figure 29 : Le sérum d'un patient atteint de dermatose linéaire à IgA reconnaît le fragment de digestion LABD97. Dépôt : 10 μ L de surnageant concentré après 3 jours de culture *in vitro* de kératinocytes en milieu de différenciation puis traitement par la plasmine (0,5U/mL pendant 4 heures).

Seul le sérum d'un patient pour lequel une suspicion clinique de DIGAL avait été évoquée permet de révéler une bande qui migre entre 100 et 85 kDa. Cette bande pourrait être le fragment de clivage LABD97. Ce résultat est confirmé par la présence d'un fort marquage sur le versant épidermique sur peau de singe clivée au NaCl, après révélation par une anti-IgA (Fig 30).

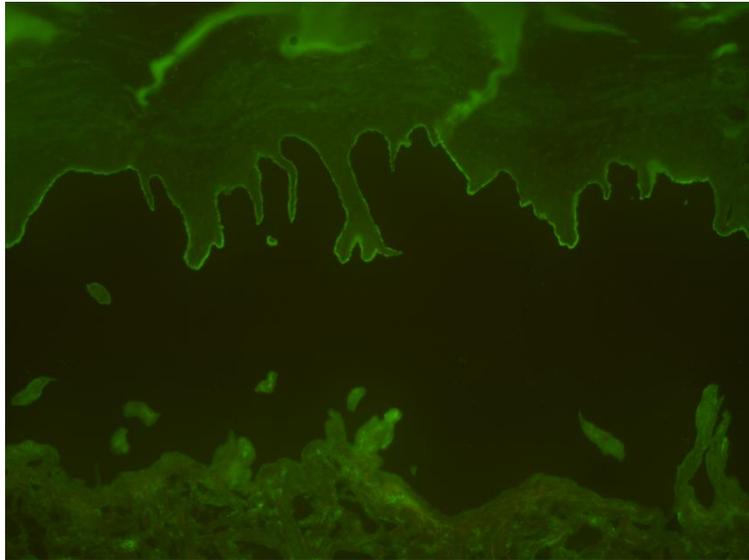


Figure 30 : Dépôt d'IgA sur le versant épidermique en peau clivée de singe pour le seul patient ayant une bande positive en LABD97.

En conclusion, la mise au point de cette technique d'immunoblot permet la mise en évidence d'anticorps capables de reconnaître les fragments de digestion de la BP180. On retient un protocole optimal d'obtention des sources antigéniques avec un traitement **20 minutes par la plasmine à 0,1 U/mL des lignées NTERT après 3 jours de culture**. Ce protocole confère un surnageant qui une fois concentré contient les deux protéines d'intérêt dans notre étude : LAD1 et LADB97.

On note que le résultat obtenu par l'immunoblot doit être contrôlé par IFI sur peau clivée afin de vérifier que la bande révélée à 120 kDa correspond effectivement aux protéines d'intérêt exprimées par les kératinocytes. On s'attend alors à une fluorescence sur le versant épidermique de la peau clivée. Ce test permet de confirmer que la bande migrant à 120 kDa est bien LAD-1. Il permettra également à l'avenir de vérifier que certains sérums de patients, qui reconnaissent une protéine migrant à 120 kDa, ne reconnaissent pas LAD-1 mais une autre protéine migrant au même poids moléculaire.

B) Recherche des IgE dans la pemphigoïde bulleuse par IFD et mise au point d'une technique ELISA

Le second objectif de ce travail était de développer un test permettant la détection d'IgE capables de reconnaître la jonction dermo-épidermique, et plus particulièrement la BP180. Dans un premier temps, nous avons tenté de détecter ces IgE sur des biopsies de peau conservées à -80°C. 51 biopsies de peau de patients pour lesquels le diagnostic de pemphigoïde bulleuse avait été posé ont été recoupées et analysées. Dans un second temps, le test qui a finalement été développé est un test ELISA permettant la recherche des IgE spécifiques du domaine NC16A de la BP180. Afin de garantir la spécificité de ce test, plusieurs populations ont été testées : des contrôles sains, des patients exempts d'auto-anticorps détectables en routine, et des patients souffrant d'autres dermatoses bulleuses auto-immunes. 87 patients atteints de pemphigoïde bulleuse ont ensuite été testés, afin de déterminer la prévalence de ces anticorps chez les patients atteints. Une population de patients a été particulièrement étudiée : les patients traités par omalizumab.

1) Détection de dépôts d'IgE sur biopsies congelées

51 biopsies de peau de patients atteints de pemphigoïde bulleuse ont été recoupées et incubées en présence d'un anti-IgE conjugué au FITC, et analysées en immunofluorescence directe. Les résultats sont présentés ci-dessous (Fig 31). Les données de la littérature étant contradictoires, et l'intensité du marquage en IgE étant faible même chez des patients positifs (Fig 32a), nous avons choisi d'évaluer de façon stricte le marquage à la membrane. Les résultats douteux ont donc finalement été considérés comme négatifs. La majorité des biopsies (87%) étaient négatives en ce qui concerne la présence d'IgE le long de la JDE. Nous avons plus souvent retrouvé un faible dépôt d'IgE à la jonction lorsque les biopsies étaient congelées depuis peu de temps.

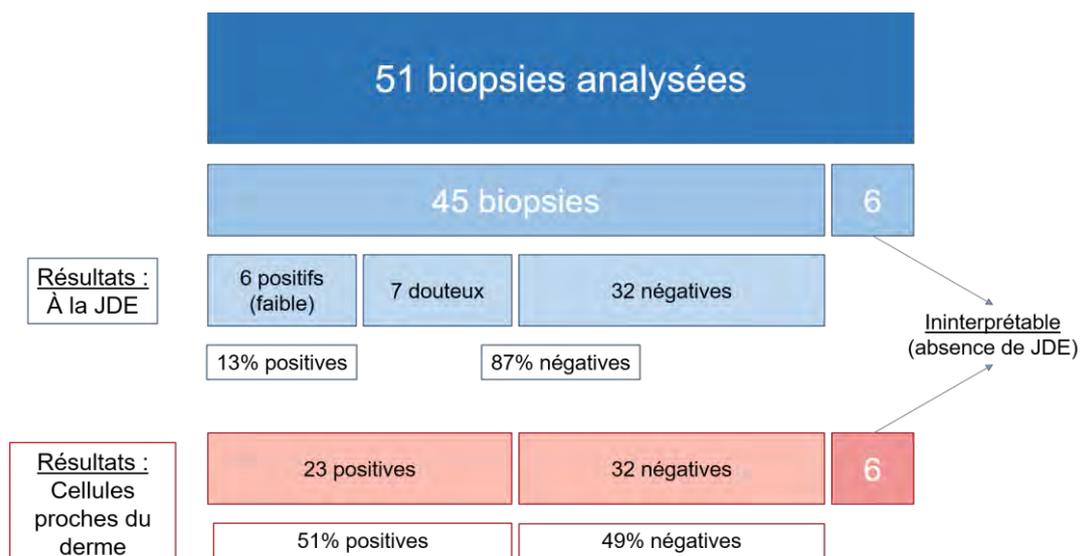


Figure 31 : Les biopsies sont rarement positives le long de la jonction dermo-épidermique, mais montrent un marquage dans plus de la moitié des cas au niveau des cellules du derme. JDE : jonction dermo-épidermique.

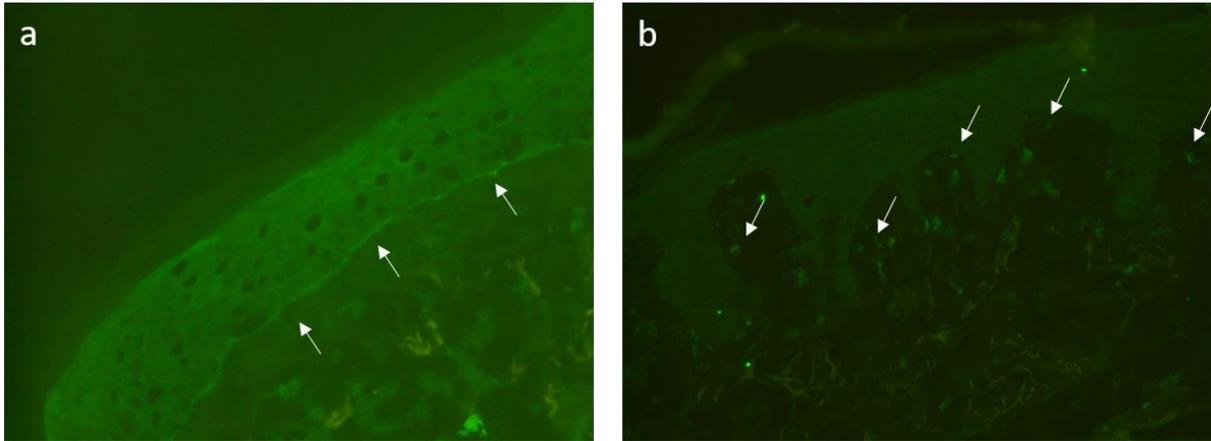


Figure 32 : a) La jonction dermo-épidermique donne un marquage faiblement positif en IgE. b) De nombreuses cellules dermiques sont marquées près de la jonction dermo-épidermique.

Nous avons en revanche constaté que pour la moitié (51%) des biopsies analysées, un marquage était présent à la surface de cellules du derme, proche de la jonction (Fig 32b). Dans le parcours de soin du patient, des biopsies de patients prélevées pour le diagnostic de pemphigoïde bulleuse sont également envoyées au service d'anatomopathologie. Nous avons comparé les résultats obtenus chez 4 patients positifs en IgE sur des cellules du derme le long de la membrane, et chez 5 patients négatifs, avec les biopsies analysées en anatomopathologie. Nous avons relu les coupes incluses en paraffine et colorées en éosine/hématoxyline avec un anatomopathologiste confirmé. Il est important de rappeler que ces biopsies ont une localisation différente pour le marquage en anatomopathologie (peau lésée) et pour la réalisation de l'IFD (peau péri-lésionnelle). Il semble toutefois que lorsque l'on observe un marquage des cellules par l'anti-IgE FITC, l'anatomopathologie retrouve un infiltrat important de polynucléaires éosinophiles dans la bulle (4/4). Lorsque l'IFD ne retrouve aucun marquage avec l'anti-IgE FITC, l'anatomopathologie retrouve parfois un infiltrat de polynucléaires important (3/5) ou bien un infiltrat pauvre ou inexistant (2/5).

En conclusion, la recherche d'IgE sur biopsie présente un intérêt limité. D'une part cette recherche doit être réalisée précocement, dès que le diagnostic de pemphigoïde bulleuse a été posé, afin de garantir la conservation des IgE dans le tissu prélevé. Dans des conditions analytiques optimales, avec l'avis d'un biologiste expérimenté, l'éventuel signal observé le long de la JDE reste faible, et il est souvent difficile d'affirmer une positivité. 16% des biopsies ont en effet été d'interprétation difficile, considérées douteuses. Devant le manque de sensibilité de cette technique, et la grande variabilité des données de la littérature, il a été décidé de développer une technique d'ELISA, plus sensible, quantitative et spécifique du domaine NC16A de la BP180.

2) ELISA : Etude du phénomène de compétition des IgG et des IgE

Un test ELISA permettant la détection des IgE anti-NC16A a été mis au point au laboratoire. Pour cela, le kit ELISA anti-BP180 4X IgG (Euroimmun®) a été utilisé. Les puits des barrettes sont revêtus par un peptide recombinant correspondant à un

tétramère du domaine NC16A de la BP180 humaine. Après plusieurs essais, une dilution des sérums au 1 :2 a été choisie comme étant la plus discriminante entre les sérums positifs et négatifs. La révélation s'effectue à l'aide d'un anti-IgE conjugué à la biotine, puis de streptavidine couplée à la peroxydase. Ce système d'amplification biotine – streptavidine, permet d'obtenir des signaux élevés malgré un titre des IgE spécifiques du domaine NC16A présumé très faible, en raison du taux extrêmement faible des IgE totales circulantes. Le signal lu à 405 nm par un spectromètre est rendu en milli-DO. A chaque expérience nous avons déposé sur la plaque : (1) un contrôle négatif (le sérum d'un individu sain) ; (2) un contrôle positif (un sérum positif en IgE anti-NC16A) ; (3) un contrôle diluant (tous les réactifs sauf le sérum, afin d'exclure une fixation non spécifique du conjugué anti-IgE) et (4) un calibrant (un sérum fortement positif dilué en série).

Les sérums des patients testés comportent la plupart du temps des taux élevés d'IgG anti-NC16A. Au cours de la mise au point du test, s'est rapidement posé la question d'un effet de compétition entre les IgG et les IgE spécifiques du domaine NC16A, la cible adsorbée sur les barrettes du kit ELISA. La différence entre les taux circulants d'IgG et d'IgE est connue (IgG sériques 10 000 fois plus élevées que les IgE). Nous avons voulu vérifier que ces IgG n'empêchent pas la détection des IgE spécifiques. Nous avons donc mesuré le taux d'IgE anti-NC16A avant, et après déplétion des IgG contenues dans le sérum des patients. Les IgG ont été retenues par trois passages sur des colonnes de protéines G. Sur la même plaque ELISA, au cours de la même expérience, les IgE anti-NC16A ont été dosées en parallèle sur neuf sérums de patients atteints de PB, dilués au 1 :2, en l'absence ou après déplétion des IgG. Trois d'entre eux étaient considérés comme positifs, et les six autres négatifs. Ces sérums ont été sélectionnés sur la base de tests préliminaires consistant à diluer les sérums et d'observer l'effet sur les valeurs obtenues en ELISA IgE anti-NC16A (données non montrées). Quinze individus contrôle ont été analysés lors de la même expérience. Le seuil pris en compte pour ces expériences a été calculé à partir des valeurs obtenues par des individus contrôles (contrôles sains de l'EFS, patients exempts d'auto-anticorps détectés au laboratoire, patients contrôles souffrant d'autres DBAI). La moyenne de ces valeurs, additionnée de deux écarts-types, correspond à une valeur de 250 milli-DO. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 33.

ELISA IgE anti-NC16A

Variation de la milliDO après déplétion des sérums en IgG

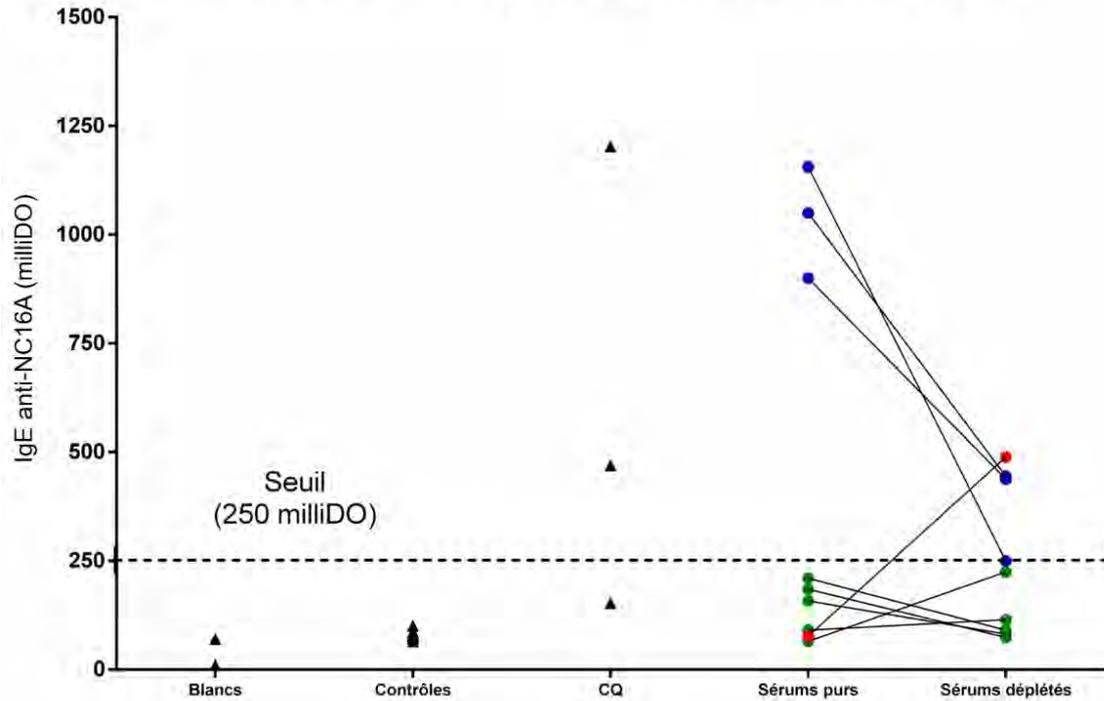


Figure 33 : Modification des taux d'IgE anti-BP180 suite à l'incubation du sérum avec des protéines G et la déplétion des IgG. De gauche à droite, on trouve les contrôles diluant (« blancs »), les contrôles sains (N = 15), les trois contrôles de qualité (CQ) déposés à chaque expérience (négatif, positif, positif fort), puis les sérums purs et les sérums après déplétion en IgG (N = 9). Les patients positifs sont représentés en bleu. Les patients négatifs sont représentés en vert. Le seul patient représenté en rouge a un taux d'IgE anti-NC16A plus élevé après déplétion des IgG.

Dans un premier temps, on constate que le témoin négatif constitué par le diluant et les contrôles sains présentent bien des valeurs de milli-DO considérées comme négatives. Les trois contrôles de qualité utilisés (contrôle négatif, contrôle moyen, contrôle haut) sont des sérums de patients passés à chaque expérience. Ces contrôles présentent les valeurs attendues retrouvées lors des précédentes expériences (données non montrées ici). Notons que pour tous ces sérums, aucune déplétion des IgG n'a été effectuée.

Concernant les trois patients considérés comme positifs (patients 1 à 3, points bleus), la déplétion des IgG provoque une importante diminution des taux d'IgE anti-NC16A. Les valeurs obtenues après déplétion sont divisées par un facteur deux à quatre, tout en restant au-dessus du seuil de positivité.

Concernant cinq des six patients considérés comme négatifs (patients 4, 5, 7, 8, 9, points verts), la déplétion des IgG semble ne pas modifier la valeur obtenue. Pour quatre d'entre eux, la valeur obtenue est légèrement plus faible. Pour l'un d'entre eux, elle est légèrement plus élevée. Notons que pour un patient (le patient 6, points rouges), la valeur obtenue après déplétion des IgG est bien plus élevée, et franchit le

seuil de positivité. Ce patient devrait donc être considéré comme positif en IgE anti-NC16A.

Le tableau suivant (Table 6) présente les résultats obtenus en milli-DO concernant les IgE anti-NC16A suivant le traitement du sérum (pur ou déplété). Les taux d'IgG dirigés contre la BP180 et la BP230 sont également présentés.

Sérum	IgG anti-BP180 NC16A	IgG anti-BP230	IgE anti-NC16A (milli-DO) Sérum pur	IgE anti- NC16A (milli-DO) Sérum déplété en IgG
1	138	177	1050	445
2	69	<2	900	438
3	68	<2	1156	250
4	>200	<2	65	82
5	189	147	185	115
6	157	<2	210	489
7	161	163	158	225
8	144	116	91	74
9	31	127	77	91

Tableau 6 : Taux d'IgG anti-NC16A et anti-BP230. Taux d'IgE anti-NC16A en fonction du traitement du sérum. Les résultats des ELISA IgG anti-NC16A et IgG anti-BP230 sont indiqués en U/mL. Les résultats de l'ELISA IgE anti-NC16A sont donnés en milli-DO. Les cases bleues représentent les patients positifs. Les cases vertes représentent les patients négatifs. Le patient 6 est représenté en rouge et donne une valeur de milli-DO considérée comme positive après déplétion des IgG.

Le tableau suivant (Table 7) présente les taux d'IgG et d'IgE dosés sur les sérums avant et après déplétion, et sur l'éluat des colonnes de protéines G :

Sérum	IgG totales (mg/L) Sérum après déplétion IgG	IgG anti-NC16A Sérum après déplétion IgG	IgE totales (kU/L) Sérum pur	IgE totales (kU/L) Sérum après déplétion IgG	IgE totales (kU/L) Eluat	IgG totales (mg/L) Eluat
1	<40	<2,00	1332	202	34,3	323,7
2	<40	<2,00	117	46,8	2,55	459,5
3	<40	<2,00	87,6	9,65	3,82	770,8
4	<40	<2,00	3,52	< 0,2	<2,00	191,3
5	<40	<2,00	2807	41,8	87,9	305,8
6	<40	<2,00	647	162	9,45	406,4
7	<40	<2,00	1052	166	23	337,6
8	<40	<2,00	455	48,6	16,4	357,9
9	<40	<2,00	685	320	2,9	428,6

Tableau 7 : Dosage des IgG et des IgE sur le sérum déplété et l'éluat. Dosages effectués sur Cobas et Phadiatop. Les cases bleues représentent les patients positifs. Les cases vertes représentent les patients négatifs. Le patient 6 est représenté en rouge et donne une valeur de milli-DO considérée comme positive après déplétion des IgG.

On constate dans un premier temps que la déplétion des IgG est complète : on ne retrouve pas d'IgG dans le sérum déplété. Cela est confirmé par la disparition des IgG anti-NC16A dans le sérum déplété. L'expérience a donc été réalisée en l'absence de compétition entre les IgG et les IgE. La déplétion des sérums en IgG provoque cependant une importante diminution du taux d'IgE totales. De façon inattendue, on

retrouve ces IgE dans l'éluat, qui ne contient pourtant que les protéines retenues par la protéine G. Notons que le volume des éluats est bien plus important que le volume initial du sérum (3,2 mL pour chaque éluat, 250 µL pour chaque sérum avant déplétion), les IgE sont donc diluées, ce qui explique les faibles taux retrouvés. A notre connaissance, une diminution si importante des IgE après déplétion des sérums en IgG n'a pas été décrite dans le cadre de la pemphigoïde bulleuse. Cette observation inattendue, d'intensité variable suivant les sérums testés, mériterait d'être analysée avec un plus grand nombre de patients, et avec une approche plus mécanistique.

Concernant les patients positifs, parallèlement à la diminution des IgE totales, la déplétion des IgG a également fortement diminué les taux d'IgE anti-NC16A. Concernant cinq sur six des patients négatifs, les valeurs de milli-DO obtenues après déplétion des IgG ne sont pas différentes. On constate pour eux aussi une forte diminution des IgE totales. Le dernier patient a révélé que la déplétion des IgG peut également avoir un effet sur les patients considérés comme négatifs : la valeur de milli-DO obtenue après déplétion des IgG est au-delà du seuil de positivité. Par ailleurs, ce patient possède des IgG anti-NC16A à un taux élevé, mais inférieur à la limite de linéarité du test. Cela indique que l'on ne peut pas suspecter une compétition entre IgG anti-NC16A et IgE anti-NC16A que chez des patients ayant des taux fortement élevés d'IgG anti-NC16A.

En conclusion, la déplétion des IgG provoque des effets inattendus et variables suivant les patients. Explorer les raisons sous-jacentes à ces phénomènes n'est pas l'objectif de cette thèse, mais plusieurs hypothèses peuvent être évoquées. La déplétion des IgG soulève plus de questions qu'elle n'apporte de réponses. Cet effet n'a pas été évoqué dans la littérature, les auteurs décrivant la plupart du temps de faibles variations après la déplétion des IgG. Malgré la révélation d'un sérum « faux négatif », la déplétion a également diminué la valeur des sérums positifs, et pourrait conduire à des « faux négatifs » si ce phénomène se reproduisait chez d'autres patients. Nous avons donc fait le choix de ne pas dépler systématiquement les sérums avant le dosage des IgE anti-NC16A.

3) Comparaison des résultats obtenus avec et sans ajout d'EDTA

Après avoir constaté l'influence de la déplétion en IgG sur les résultats obtenus, nous avons poursuivi la mise au point de la technique ELISA. Certains tests biologiques où les cibles antigéniques sont fortement rapprochées peuvent perturber la détection des anticorps fixés sur leur cible. Cet effet est dû à la présence du complément, et a été décrit dans certaines techniques de détection des IgG dirigées contre des antigènes HLA. Dans ces techniques automatisées, l'emploi de billes portant une densité élevée d'antigènes HLA entraîne parfois l'absence de détection des anticorps fixés. La proximité des fragments Fc des IgG spécifiques liées à leur cible permet la fixation du fragment C1q du complément. En présence de calcium, les fragments C1r et C1s du complément se fixent à leur tour sur le fragment C1q. L'encombrement stérique du complexe C1(qrs) relié aux extrémités Fc des IgG est ensuite renforcé par la liaison du fragment C3d. La révélation par l'anticorps conjugué secondaire est alors perturbée par cet encombrement stérique. Ce phénomène a mené à l'absence de détection des

anticorps anti-HLA (183). L'utilisation d'EDTA, de C1 inhibiteur ou le pré-traitement des sérums à 56°C permet d'empêcher la formation des tétramères de C1s et C1r et leur fixation sur le fragment C1, limitant ainsi l'encombrement stérique. Les IgG anti-HLA fixées sur le support sont alors détectées (184,185). Ce phénomène a été appelé « effet prozone du complément ».

Dans le cas présent, les motifs antigéniques sont présents de façon suffisamment dense pour évoquer ce phénomène. En effet, le peptide antigénique adsorbé sur les puits est un tétramère du domaine NC16A (cf Fig 11). Il était important de vérifier l'absence de conséquences du phénomène décrit ci-dessus. Les IgE sont fragiles, il était donc impossible de dé-complémenter les sérums par chauffage avant la réalisation des dosages. Nous avons donc choisi d'analyser l'effet de l'incubation des sérums dans un tampon de dilution contenant 10mM d'EDTA, une concentration suffisante pour chélater les ions calcium présents dans le sérum. Trois sérums de patients considérés comme positifs et six sérums considérés négatifs en IgE anti-NC16A ont été sélectionnés. Les sérums ont été dilués au 1 :2 dans deux tampons différents uniquement par l'ajout ou non d'EDTA. Les IgE anti-NC16A ont ensuite été dosées lors de la même expérience. Les résultats sont présentés dans la figure 34.

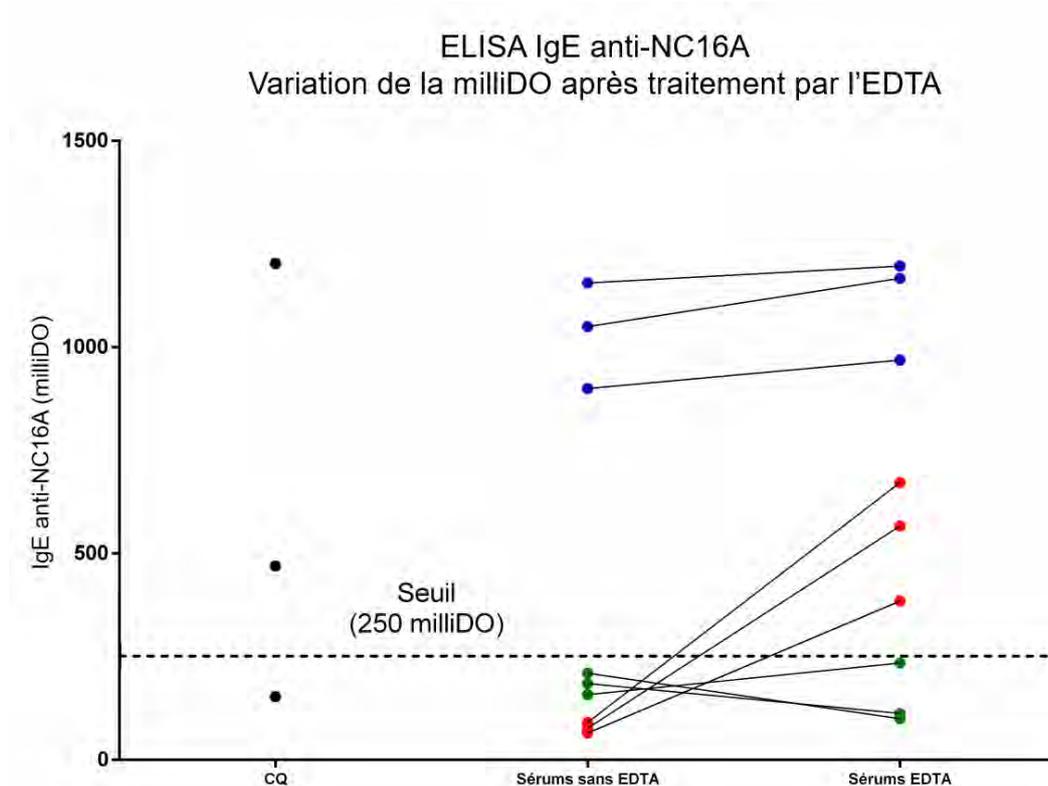


Figure 34 : Effet de l'EDTA sur les taux circulants d'IgE anti-NC16A. Les trois contrôles de qualité valident l'expérience. Les sérums de patients positifs sans EDTA sont représentés en bleu. Les sérums des patients négatifs qui se positivent avec EDTA sont représentés en rouge. Les sérums des patients négatifs dont la valeur n'est pas modifiée après ajout d'EDTA sont représentés en vert.

En prenant en compte la variabilité intrinsèque au test, on constate que les valeurs de milli-DO obtenues après ajout d'EDTA sont soit identiques, soit plus élevées qu'en absence d'EDTA dans le tampon de dilution.

- Pour les 3 patients positifs (**points bleus**), des taux élevés d'IgE anti-NC16A sont retrouvés en présence ou en l'absence d'EDTA sans variation importante de la milli-DO
- Pour trois des six patients considérés comme négatifs (**points rouges**), la présence d'EDTA provoque une augmentation importante de la milli-DO mesurée. Cette augmentation est suffisamment élevée pour considérer ces patients positifs pour les IgE anti-NC16A, en présence d'EDTA.
- Pour les trois derniers patients négatifs (**points verts**), l'ajout d'EDTA ne modifie que peu les milli-DO mesurées. Ces patients sont donc considérés comme réellement négatifs.

Nous avons donc analysé à nouveau 29 patients et 15 contrôles sains pour lesquels nous avons déjà dosé les IgE anti-NC16A, mais en diluant cette fois le sérum au 1 :2 dans un tampon contenant de l'EDTA. Nous avons comparé les valeurs obtenues chez ces patients, dans la figure 35.

La gamme de calibration n'a pas été traitée de la même manière lors des deux expériences (dilution sans ou avec EDTA). Or le calibrateur est sujet à une variation de la DO après ajout d'EDTA (augmentation des valeurs en milli-DO). Nous n'avons donc pas pu normaliser les valeurs obtenues en milli-DO par rapport au calibrant. Pour comparer les milli-DO obtenues et mettre en évidence les variations observées, nous avons procédé ainsi :

- Les sérums de patients pour lesquels la milli-DO est modifiée de moins de 20% après ajout de l'EDTA, ainsi que les contrôles sains, ont été sélectionnés
- Une droite de régression a été tracée avec ces sérums
- L'équation de cette droite a servi à calculer la valeur théoriquement attendue dans l'expérience avec l'EDTA, à partir de la valeur obtenue lors de l'expérience sans EDTA

Cette méthode permet d'écarter les points pour lesquels l'ajout d'EDTA provoque une variation importante de la milli-DO, en conservant les points peu variables. L'équation de la droite obtenue est sensée représenter la variation entre les deux expériences. Les valeurs pour lesquelles une variation importante était constatée ne devaient pas être prise en compte, car dans leur cas la variation est supposée être due à la présence d'EDTA.

- Une fois les valeurs théoriques obtenues, l'écart à la moyenne entre la valeur théorique attendue et la valeur obtenue a été calculée pour chaque point.
- Tous les points pour lesquels une variabilité inférieure à 15% entre la valeur théorique et la valeur mesurée ont été conservés pour construire une droite de régression, d'ordonnée à l'origine proche de zéro, et dont les points sont représentés en bleu (Fig 35).
- 16 sérums de patients, ainsi que la totalité des contrôles sains (N = 15), sont considérés comme suffisamment peu variables pour construire cette courbe (**points bleus**).

- 13 sérums voient leur DO fortement modifiée après l'ajout d'EDTA, ils ont été représentés **en orange** (Fig 35).
- Un seul point, signalé par une astérisque, est problématique, sa variation par rapport à la valeur théorique reste supérieure à 15% qu'il soit inclus, ou non, dans le calcul de la droite de régression. Le choix a finalement été pris de l'inclure dans le calcul malgré une variation de 15,92% par rapport à la valeur théorique attendue selon nos calculs.

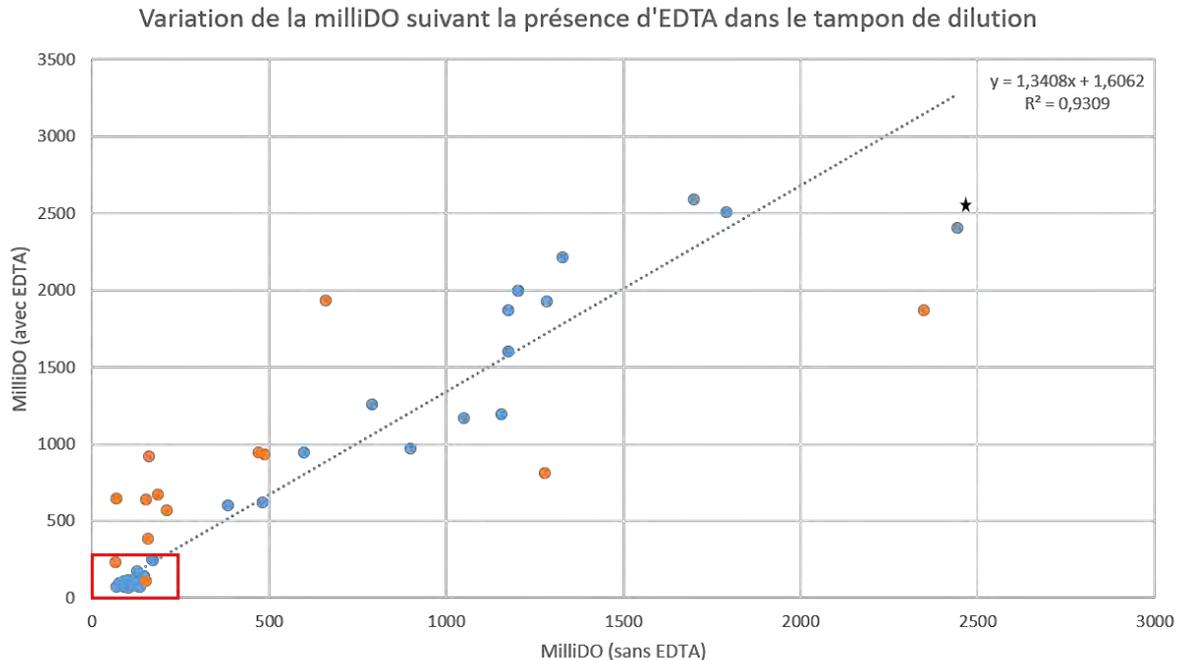


Figure 35 : L'ajout d'EDTA permet d'obtenir des valeurs de milli-DO supérieures au seuil de positivité pour certains patients considérés négatifs jusqu'alors. Le cadre rouge indique le seuil à partir duquel les valeurs sont considérées positives (250 milli-DO). Les points bleus sont les points ayant servi à construire la droite de régression, ce sont ceux dont l'écart à la moyenne n'excède pas 15% entre la valeur théoriquement attendue et celle obtenue avec EDTA. Les points orange représentent les points pour lesquels l'écart à la moyenne est supérieur à 15% et donc pour lesquels la variabilité peut être due à l'ajout d'EDTA. Le point indiqué par une astérisque est le plus écarté de la droite de régression mais a quand même été intégré dans le calcul de cette dernière car sa non-intégration au calcul de la droite ne change pas significativement les conclusions.

- Les valeurs théoriques attendues ont donc été extrapolées par rapport aux valeurs obtenues sans EDTA, selon l'équation de la droite ci-dessus.
- Les valeurs théoriques et les valeurs obtenues avec l'EDTA ont été également représentées sur le même graphe, afin de vérifier si les valeurs se répartissaient d'une manière similaire. La même répartition des points était effectivement observée autour de la droite de régression (données présentées en annexe 4).

De cette manière, nous vérifions que les points éloignés par rapport à la valeur attendue sont répartis de la même manière. On obtient ainsi un graphique qui met en évidence les points dont les valeurs sont modifiées lors de l'ajout d'EDTA. Le détail des valeurs obtenues en milli-DO est donné dans la table en annexe (Annexe 5). Le

seuil pris en compte pour ces expériences à été calculé de la même manière que dans le paragraphe 2) et correspond à une valeur de 250 milli-DO.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

La droite de régression obtenue possède un coefficient de corrélation R^2 de 0,93 et une ordonnée à l'origine proche de zéro. Elle décrit la variation des milli-DO mesurés explicables par la variation entre les deux expériences (Fig 35). Les contrôles contenant tous les réactifs sauf le sérum, ou tous les réactifs sauf le sérum et le conjugué anti-IgE, ne voient pas leur valeur augmenter après l'ajout d'EDTA (données non montrées ici). Les valeurs obtenues pour les contrôles sains (N=15) ne sont pas augmentées en cas d'ajout d'ETDA. Ces résultats confirment que l'augmentation de la DO observée chez certains patients après ajout d'EDTA n'est pas un artéfact dû à la seule utilisation d'EDTA.

Les valeurs obtenues avec le calibrateur (un patient fortement positif dilué en série) augmentent légèrement pour les dilutions élevées, (1/128 ; 1/64) et de façon plus importante pour les dilutions plus faibles (1/2 ; 1/8 ; 1/16). La variation entre la valeur théorique et la valeur obtenue reste néanmoins inférieure à 15%.

Concernant les patients atteints de PB (N=29), on constate que :

- Pour les patients positifs, l'ajout d'EDTA peut, ou non, modifier la valeur obtenue en milli-DO. En cas de modification, les valeurs obtenues sont la plupart du temps augmentées.
- De rares patients positifs (N = 2) ont des valeurs en milli-DO plus faibles après l'ajout d'EDTA, sans toutefois diminuer la valeur obtenue au point de les considérer négatifs
- Les sérums pour lesquels la milli-DO est plus élevée après l'ajout d'EDTA sont essentiellement des sérums de patients qui étaient considérés négatifs
- Une partie des patients considérés négatifs conserve une milli-DO en dessous du seuil malgré l'ajout d'EDTA
- Une part importante d'entre eux voient au contraire la valeur de la milli-DO augmenter, et passer largement le seuil de positivité.
- La plupart des points variables après l'ajout d'EDTA se retrouve dans la zone située au-dessus de la courbe de régression

En s'intéressant à la zone proche du seuil de positivité, matérialisée par un cadre rouge (Fig 35), on constate qu'un certain nombre de patients était considéré comme négatif. L'ajout d'EDTA a permis de révéler que ces patients (N=6) possèdent en réalité des IgE anti-BP180 circulantes. Les **six points orange** situés au dessus du cadre rouge représentent en effet des patients considérés comme négatifs jusque là. L'ajout d'EDTA dans le tampon de dilution du sérum peut donc avoir deux conséquences : (1) soit une faible modification de la valeur de la milli-DO mesurée ; (2) soit une augmentation de la valeur de la milli-DO mesurée. Dans ce second cas, cet effet semble particulièrement important lorsque des patients considérés comme négatifs

obtiennent des valeurs de milli-DO supérieures au seuil de positivité. L'ajout de l'EDTA permet donc de rendre positifs en IgE anti-NC16A certains sérums considérés comme négatifs en l'absence de traitement par l'EDTA. Nous avons donc choisi d'ajouter de l'EDTA dans la procédure appliquée à tous les sérums afin de sensibiliser le dépistage des IgE anti-NC16A.

Enfin, pour écarter un effet particulier de l'EDTA sur les sérums pour lesquels les valeurs obtenues en IgE anti-NC16A sont plus élevées, nous avons repris dix sérums concernés par cette modification de la milli-DO après l'ajout d'EDTA. Nous avons ensuite dosé les IgG anti-NC16A sur ces dix sérums, avant et après l'ajout d'EDTA, dans deux expériences indépendantes, et en présence de la gamme de calibration et des témoins du kit commercial de dosage des IgG anti-NC16A. Nous avons obtenu une répartition très proche pour la plupart des points (cf Fig 36).

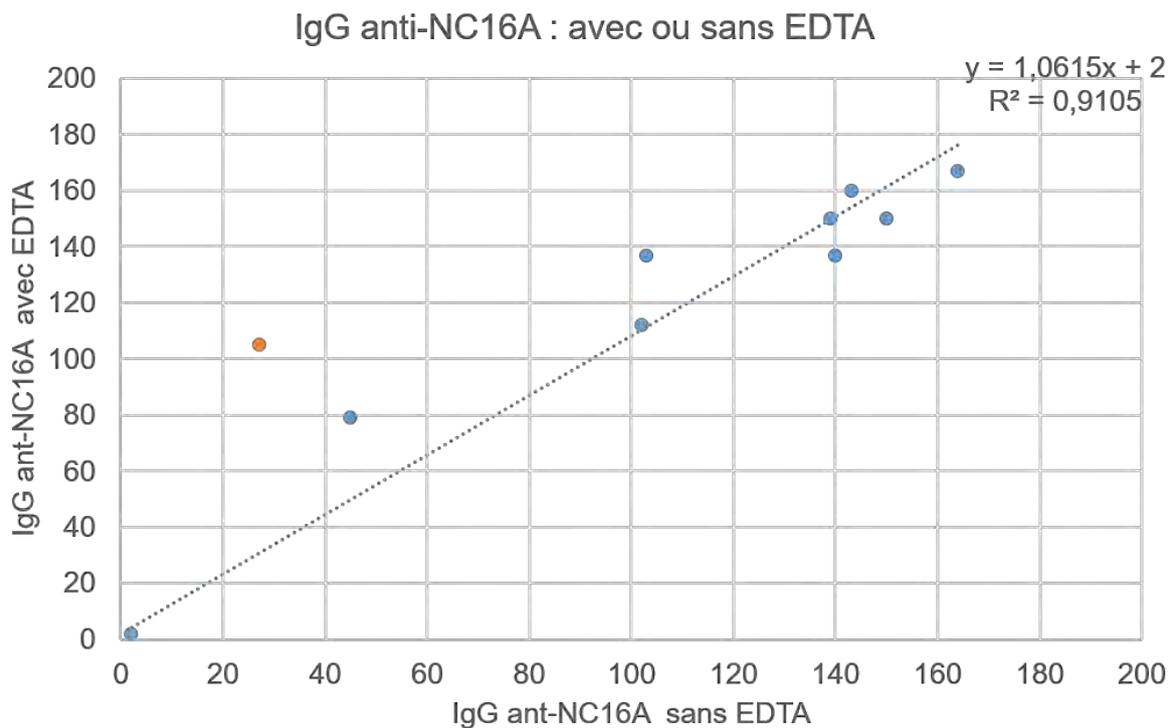


Figure 36 : L'ajout d'EDTA ne modifie pas le taux d'IgG anti-NC16A. L'ordonnée à l'origine de la droite est de 2 (valeur minimale dosée par l'ELISA). La droite de régression a été calculée à partir de 9 des 10 points obtenus (en bleu). Le seul point variable (en orange) est déjà positif en l'absence d'EDTA.

A l'exception d'un point, l'ajout d'EDTA ne modifie pas le taux d'IgG anti-NC16A. Notons que pour ce patient particulier, ce résultat ne change pas la positivité au test, la valeur obtenue est au dessus du seuil de positivité. Cette expérience démontre que l'ajout d'EDTA a un effet propre sur le dosage des IgE anti-NC16A, et sensibilise le test ELISA développé.

4) Normalisation, détermination d'un seuil et validité de la méthode

Une fois tous les dosages effectués en présence d'EDTA, toutes les valeurs obtenues ont été normalisées en unités arbitraires (UA), à l'aide d'un sérum de patient défini en tant que calibrant et dilué en série. Aux dilutions suivantes (1/2, 1/8, 1/16, 1/64, 1/128) ont été attribuées les valeurs arbitraires de 1000, 250, 125, 31,25 et 15,6. A chaque expérience, une courbe de calibration était obtenue par les valeurs du calibrant en milli-DO. La droite de régression a été calculée, en représentant le logarithme de la valeur obtenue en milli-DO pour ce calibrant en fonction du logarithme de la valeur en UA. Cette droite permet ensuite de déterminer la valeur des sérums testés, en UA. Les coefficients de variation du coefficient de corrélation (a) et de l'ordonnée à l'origine (b) de ces droites sont un indicateur de la faible variabilité entre les différentes expériences. Ils sont indiqués dans le tableau 8, pour N = 7 expériences. Un coefficient de variation du coefficient directeur de la droite inférieur à 10% pour un test ELISA est une donnée importante permettant d'évaluer la fiabilité du test.

Moyenne (a)	0,549	CV (a) =	8,67%
Ecart-type (a)	0,0476		
Moyenne (b)	1,621	CV (b) =	15,55%
Ecart-type (b)	0,2522		

Tableau 8 : Moyenne et coefficients de variation (CV) des coefficients de proportionnalité (a) et de l'ordonnée à l'origine (b). N = 7 expériences.

Un contrôle négatif a été défini : le sérum d'un individu sain (contrôle de l'EFS). Un contrôle positif a également été défini : le sérum d'un patient atteint de PB et possédant un taux d'IgE anti-NC16A intermédiaire, autour de 280 UA.

Pour déterminer un seuil de positivité et vérifier l'absence de fausse positivité, plusieurs populations différentes ont été sélectionnées. Dans un premier temps, 40 sérums d'individus sains ont été obtenus à partir de dons anonymes à l'EFS (Etablissement Français du Sang). Les IgE totales et les IgE anti-NC16A ont été dosées, afin de vérifier la spécificité du dosage des anticorps anti-NC16A d'isotype IgE (Fig 37).

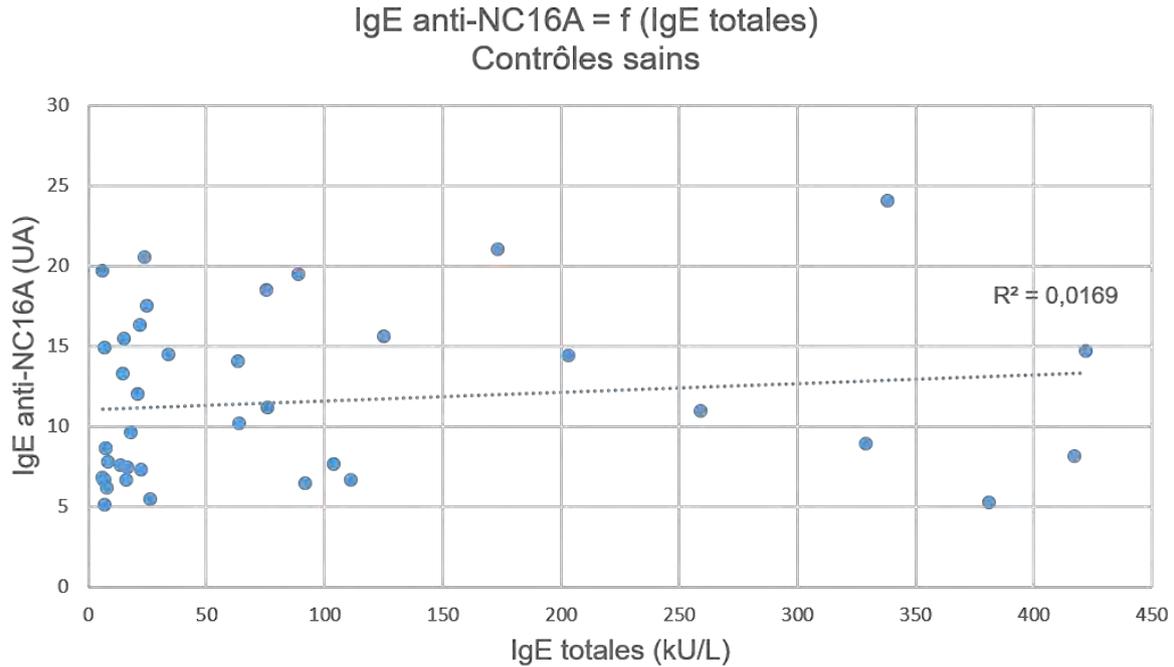


Figure 37 : Absence de corrélation entre le taux d'IgE totales et le taux d'IgE anti-BP180 chez les individus sains.

Il n'y a aucune corrélation entre le taux d'IgE totales et la valeur obtenue en UA, selon les tests de corrélation de Pearson et de Spearman (données non montrées). Le fait que les sérums contenant des taux élevés d'IgE, parfois supérieurs à la normale, ne soient pas les sérums donnant des valeurs plus élevées en IgE anti-NC16A confirme la spécificité du test et l'absence de fixation non spécifique des IgE des patients sur les puits revêtus de l'antigène NC16A.

D'autres populations ont également été testées afin d'établir un seuil. 42 patients contrôles, c'est-à-dire ne possédant aucun auto-anticorps détectable au laboratoire d'auto-immunité, ont été sélectionnés. Parmi eux, 7 d'entre eux souffraient de dermatose d'origine non auto-immune. 17 patients souffrant de dermatose bulleuse autre que la pemphigoïde bulleuse ont également été inclus. Enfin, les sérums de 87 patients souffrant de PB ont été testés pour la présence d'IgE anti-NC16A. La figure 38 résume les populations incluses. Les IgE anti-NC16A ont été dosées chez tous ces patients.

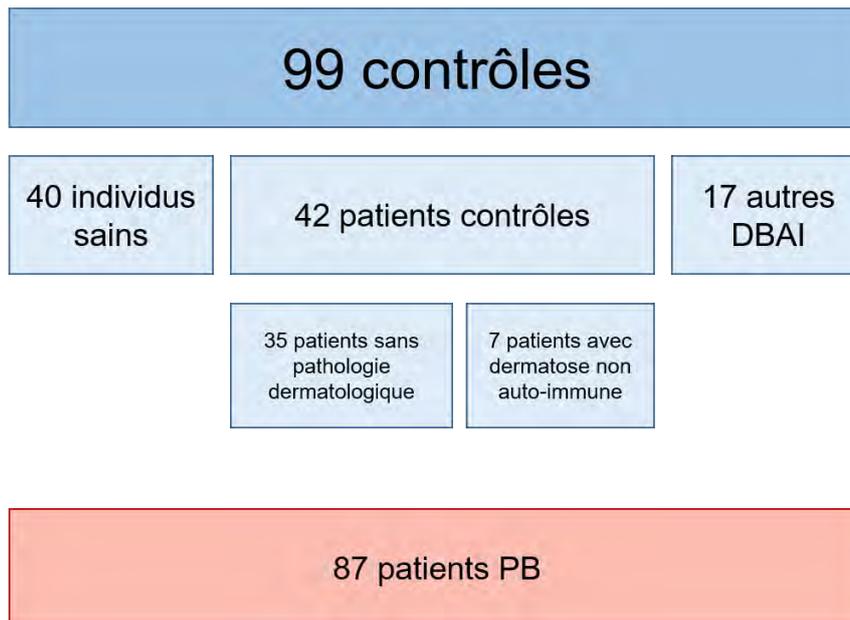


Figure 38 : Répartition des patients testés en ELISA IgE anti-NC16A. 99 sujets contrôles ont été sélectionnés afin d'établir un seuil de positivité. 87 patients atteints de pemphigoïde bulleuse ont ensuite été testés.

Plusieurs seuils ont été définis, à l'aide de la série d'instruction disponible en ligne « Reference Value Advisor » selon la méthode « Box-Cox » (179) : (1) un seuil en incluant seulement les individus sains (2) un seuil en incluant individus sains et patients contrôles (exempts de toute maladie auto-immune) et (3) un seuil clinique, en incluant les individus sains, les patients contrôles et des patients atteints de dermatoses auto-immunes ou non auto-immunes autres que la PB. Cette série d'instruction étudie la répartition des valeurs natives et des valeurs transformées par la méthode « Box-Cox ». Cette dernière vise à rendre la distribution des valeurs étudiées normales. Parmi d'autres tests, un test non paramétrique est ensuite effectué sur les distributions obtenues, afin d'établir un seuil. Les seuils et les intervalles de confiance obtenus en prenant en compte les populations contrôles sont présentés dans la table 9.

Population et effectif	Nature du test	Distribution des valeurs « Box-Cox »	Seuil	IC 90% du seuil
N=40 contrôles sains	Non paramétrique	Non normale	24,0 (UA)	[20,5 ; 24,1]
N=75 contrôles (individus sains et patients contrôles)	Non paramétrique	Normale	29,3 (UA)	[24,1 ; 36,9]
Tous les patients non PB (N=99)	Non paramétrique	Non normale	28,5 (UA)	[24,8 ; 36,9]

Tableau 9 : Seuils et intervalles de référence de chaque population contrôle selon la série d'instructions « Reference Value Advisor ».

Le seuil retenu est à la fois celui donnant la valeur la plus élevée, et celui pour lequel la population se répartit d'une manière se rapprochant de la loi normale en test « Box-Cox ». La valeur de 29,3 est donc considérée comme le seuil le plus pertinent. Si l'on détermine le seuil de positivité de façon plus empirique en assumant que la distribution des valeurs est normale, en prenant en compte la moyenne de la population contrôle à laquelle on ajoute trois déviations standard, la valeur obtenue est de 31, soit très

proche du seuil obtenu par la méthode précédente. La valeur du seuil a donc été définie à 30 unités arbitraires.

Le contrôle positif passé dans chaque expérience est le même sérum, issu d'aliquots réalisés à partir du même tube. Le contrôle de qualité positif donne les valeurs suivantes (représentation en graphique de Levey-Jennings) (Fig 39).

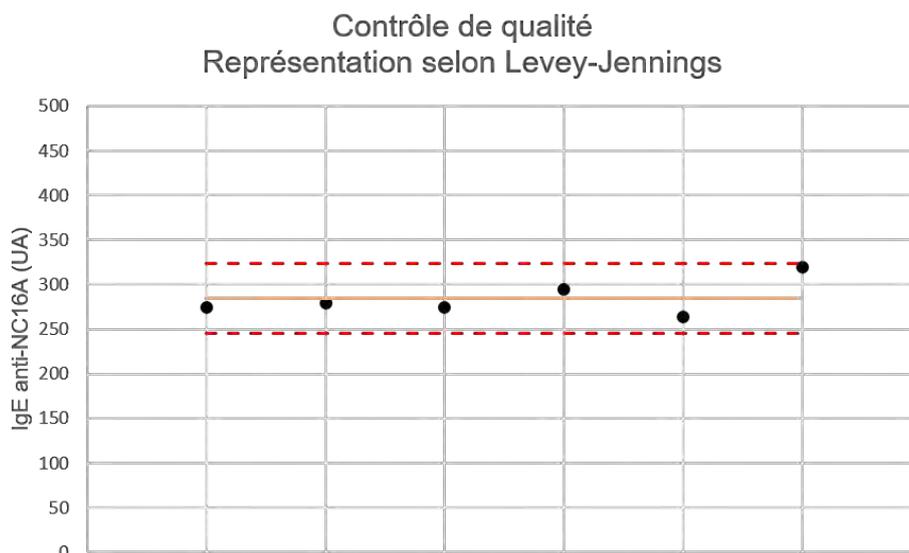


Figure 39 : Représentation en graphique de Levey Jennings des valeurs obtenues (en UA) par le dosage du contrôle de qualité. Tous les points se situent autour de la moyenne de tous les points obtenus (en orange), et ne s'en écartent jamais de plus de deux écarts-types (bornes supérieure et inférieure, en rouge).

5) Résultat du dosage des IgE anti-NC16A par ELISA

Une fois tous les sérums analysés en présence d'EDTA et avec le seuil défini à 30 UA (individus sains et patients contrôles) on obtient les résultats suivants résumés dans la Table 10.

Groupes	N	Positifs (%)	Négatifs (%)	Âge (moyenne)	Ratio M/F
Individus sains	40	0/40 (0%)	40/40 (100%)	40,4	1
Patients contrôles	42	2/42 (5%)	40/42 (95%)	63	1,05
Autres DBAI	17	1/17 (6%)	16/17 (94%)	60	1,42
Tous les contrôles	99	3/99 (3%)	96/99 (97%)	53,4	1,1
Pemphigoïde bulleuse	87	70/87 (80%)	17/87 (20%)	82	1,37

Tableau 10 : Populations testées et résultats de l'ELISA anti-NC16A.

Les différents groupes obtenus ne sont pas comparables en ce qui concerne l'âge : malgré une recherche de patients âgés en tant que contrôles, l'âge moyen des individus atteints de PB reste très élevé. Par ailleurs, les donneurs sains de l'EFS sont des individus plutôt jeunes, et ce groupe a donc une moyenne d'âge plus basse. Le

ratio M/F est proche de 1 pour les populations contrôles, et légèrement en faveur des hommes dans le groupe des patients souffrant de PB.

Les résultats obtenus indiquent que le seuil sélectionné est très sensible : 80% des patients PB ont des IgE anti-NC16A. Un très faible nombre (N=3) de contrôles sont positifs, mais possèdent des valeurs limites, juste au-dessus du seuil. La figure 40 représente valeurs obtenues en UA des différentes populations étudiées.

ELISA IgE anti-NC16A Comparaison des populations étudiées

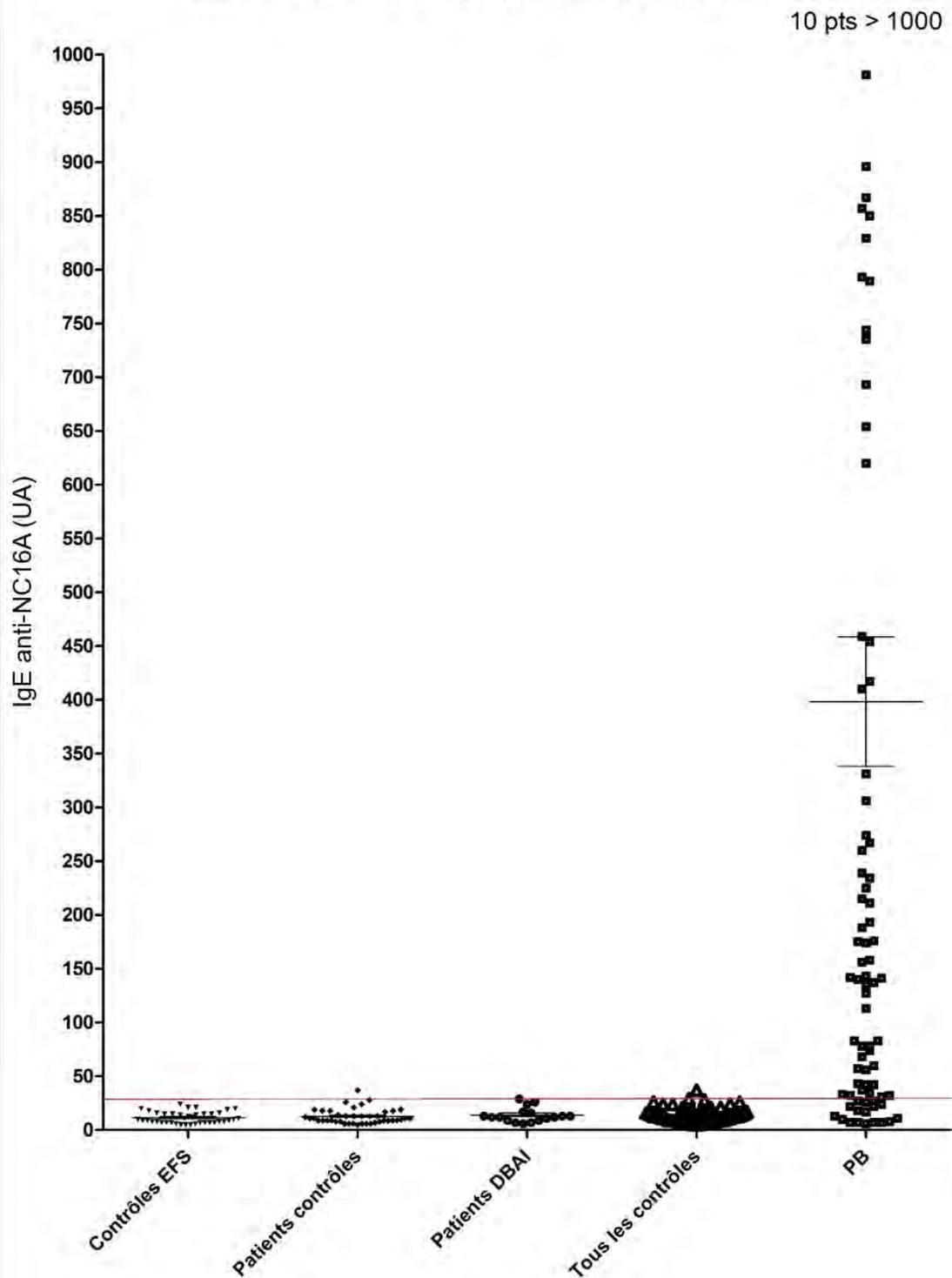


Figure 40 : Seuls les patients atteints de PB présentent des taux élevés d'IgE anti-NC16A. Le seuil de 30 UAe est représenté par une ligne rouge. Les contrôles de l'EFS (N = 40), les patients contrôles (N = 42) et les patients atteints de DBAI autres que la PB (N = 17) sont regroupés dans la population nommée « Tous les contrôles ». Seuls des patients atteints de PB (N = 87) possèdent des taux d'IgE anti-NC16A fortement élevés.

87 patients atteints de pemphigoïde bulleuse ont été analysés. La plupart d'entre eux sont positifs en IgE anti-BP180 (70/87 soit 80%). Notons que 10 points présentent des valeurs en UA supérieures à 1000, hors de la zone de linéarité car la valeur maximale définie du calibrant est 1000 UA. Ils ne sont donc pas représentés sur la figure mais indiqués en haut du graphique.

On constate qu'un grand nombre de patients atteints de PB possède des IgE anti-NC16A. Les valeurs obtenues par ce test sont très étalées, certains patients étant proches du seuil de positivité, et d'autres en dehors de la limite de linéarité. Toutefois, la plupart des taux mesurés se trouve entre ces deux extrêmes. Seule la population de patients atteints de PB présente une telle répartition.

Sur les 17 patients négatifs en IgE anti-NC16A on note que :

- Trois patients sont seulement positifs en BP230 et n'ont jamais eu d'IgG anti-NC16A.
- Neuf patients possèdent des IgG anti-NC16A.
- Six patients sont négatifs en IgG anti-NC16A et en IgG anti-BP230. Ces patients présentaient une présentation clinique évocatrice de PB, et le diagnostic a été confirmé par un dépôt d'IgG et de complément le long de la jonction en IFD chez tous ces patients. Cinq de ces six patients avaient également une infiltration sous-épidermique de polynucléaires éosinophiles constatée en anatomopathologie.

Un seul patient a toujours été négatif en IgG anti-NC16A mais est néanmoins positif en IgE anti-NC16A. Pour deux patients, les taux d'IgE anti-NC16A sont encore élevés, malgré la négativation des taux d'IgG anti-NC16A au moment du dosage. Il semble donc, à l'exception d'un patient, que l'on retrouve des IgE anti-NC16A chez des patients ayant également des IgG anti-NC16A. Les patients étant seulement positifs en IgG anti-BP230 ne possèdent pas d'IgE anti-NC16A. La totalité des informations cliniques et biologiques est résumée en annexe (Annexe 6).

6) Comparaison des sous-groupes en fonction des paramètres biologiques

La population de patients atteints de pemphigoïde bulleuse est constituée de 87 patients. Le diagnostic a été fait sur la clinique, la positivité des biopsies en IFD et en anatomopathologie, et sur la présence d'anti-BP180 et d'anti-BP230. L'ensemble des informations cliniques et biologiques a été recueilli pour ces patients (résumé dans l'annexe 6). Nous avons ensuite recherché la présence d'une corrélation entre le taux d'IgE anti-NC16A et des différents paramètres biologiques.

a) Comparaison des taux d'IgE anti-NC16A et d'IgG anti-NC16A :

La totalité des résultats a été présentée sur la figure 41. La limite de linéarité de l'ELISA IgE anti-NC16A est de 1000 UA. Celle de l'ELISA IgG anti-NC16A est de 200 U. Seuls

les points présentant des valeurs inférieures à la limite de linéarité des deux méthodes ont été représentés soit N = 58 patients. La présence d'une éventuelle corrélation entre IgG et IgE anti-NC16A a été recherchée (Fig 41).

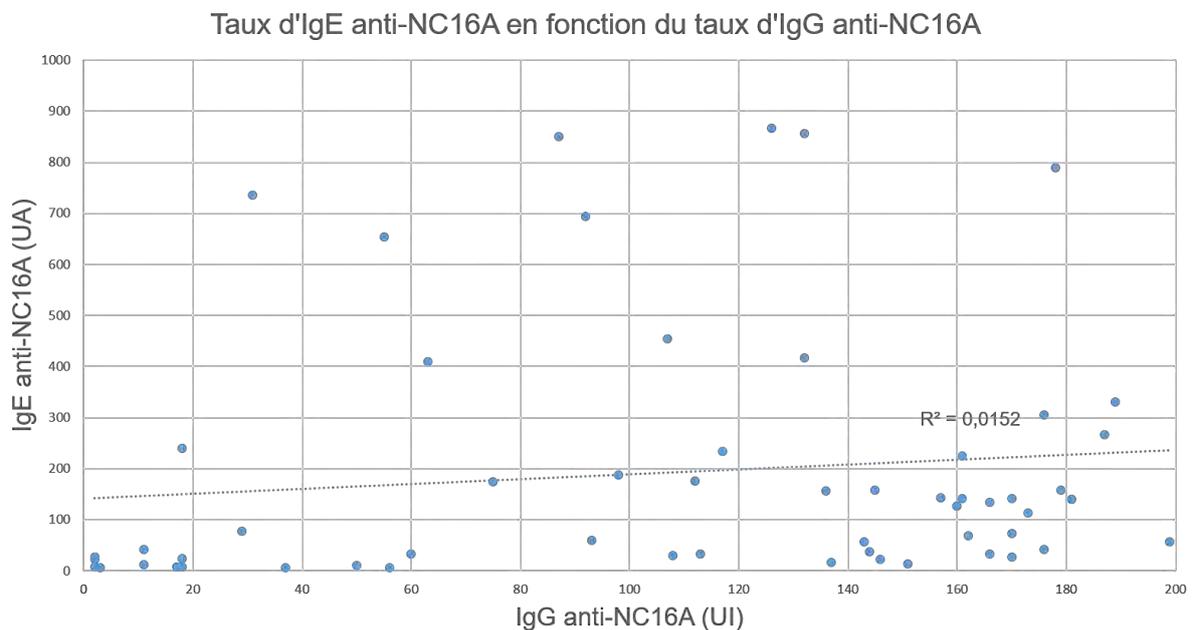


Figure 41 : Corrélation entre les taux d'IgE anti-NC16A et d'IgG anti-NC16A

Les valeurs obtenues ne sont pas corrélées selon le test de corrélation de Pearson ($r = 0,0801$; $p = 0,461$) ce qui signifie qu'il n'y a pas de proportionnalité dans les variations des taux d'IgE et d'IgG. Le R^2 de la droite de régression ci-dessus est très éloigné de 1, ce qui confirme que la variation des taux d'IgE anti-NC16A en fonction des taux d'IgG anti-NC16A n'est absolument pas proportionnelle. La présence d'IgG anti-NC16A chez tous les patients possédant des IgE anti-NC16A, sauf un, semble néanmoins indiquer que l'on retrouve des IgE anti-NC16A seulement chez des patients ayant par ailleurs produit des IgG contre cette cible.

b) Taux d'IgE totales

Depuis quelques années, les taux d'IgE totales sont dosés chez les patients atteints de pemphigoïde bulleuse. Pour un certain nombre de patients (antérieurs à 2019) les taux d'IgE n'étaient pas disponibles. 41 patients sont donc analysés quant à l'existence d'un lien entre le taux d'IgE totales et celui d'IgE anti-NC16A. Le taux d'IgE anti-NC16A a été représenté en fonction du taux d'IgE totales chez ces patients (Fig 42).

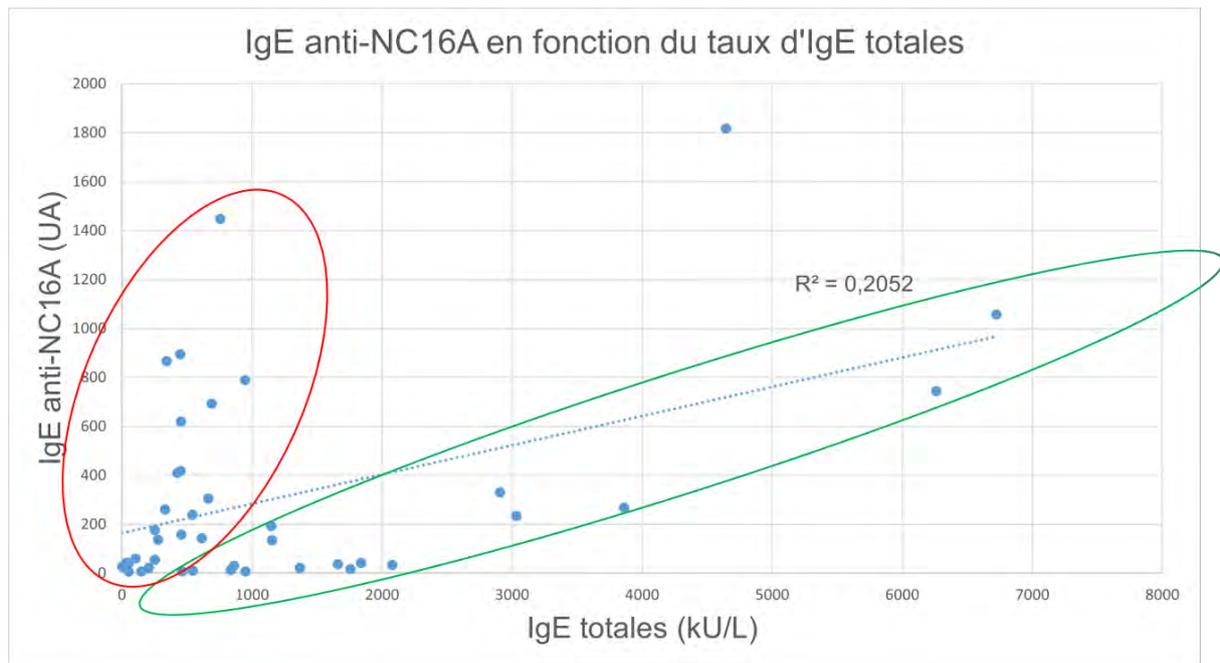


Figure 42: Corrélation entre le taux d'IgE anti-NC16A et le taux d'IgE totales

Selon le test de corrélation de Spearman, il n'y a pas de corrélation entre le taux d'IgE totales et le taux d'IgE anti-NC16A ($r = 0,2524$; $p = 0,1113$). Cependant, une partie des points (entourés en vert) est répartie de façon particulière, le long de la droite de régression tracée. Ces points semblent répartis de façon proportionnelle au taux d'IgE totales. On peut suspecter pour ces points que le signal détecté en ELISA IgE anti-NC16A soit en réalité un signal non spécifique, dû à l'adsorption des IgE sur les puits de polystyrène. Pour les points entourés en rouge, il est clair que le signal obtenu en ELISA IgE anti-NC16A est dû à la présence d'IgE capables de reconnaître leur cible.

La répartition de ces points a été étudiée par le calcul d'un ratio entre le taux d'IgE anti-NC16A et le taux d'IgE totales. Une répartition similaire des points était constatée, et une droite de régression a été calculée en sélectionnant les points pour lesquels le signal mesuré en ELISA IgE anti-NC16A semblait varier en fonction du taux d'IgE totales. Les résultats sont présentés en annexe (Annexe 7). Cette analyse semble montrer que pour certains patients, entourés en vert, le signal obtenu en ELISA IgE anti-NC16A varie de façon proportionnelle au taux d'IgE totales.

c) Taux de PNE circulants et présents le long de la jonction

L'analyse des biopsies en anatomopathologie s'intéresse à la présence de PNE au niveau de la bulle. Plusieurs auteurs ont tenté de corréler les taux d'éosinophiles circulants à la présence d'IgE anti-NC16A. Ces données étaient disponibles chez 80 patients (Fig 43).

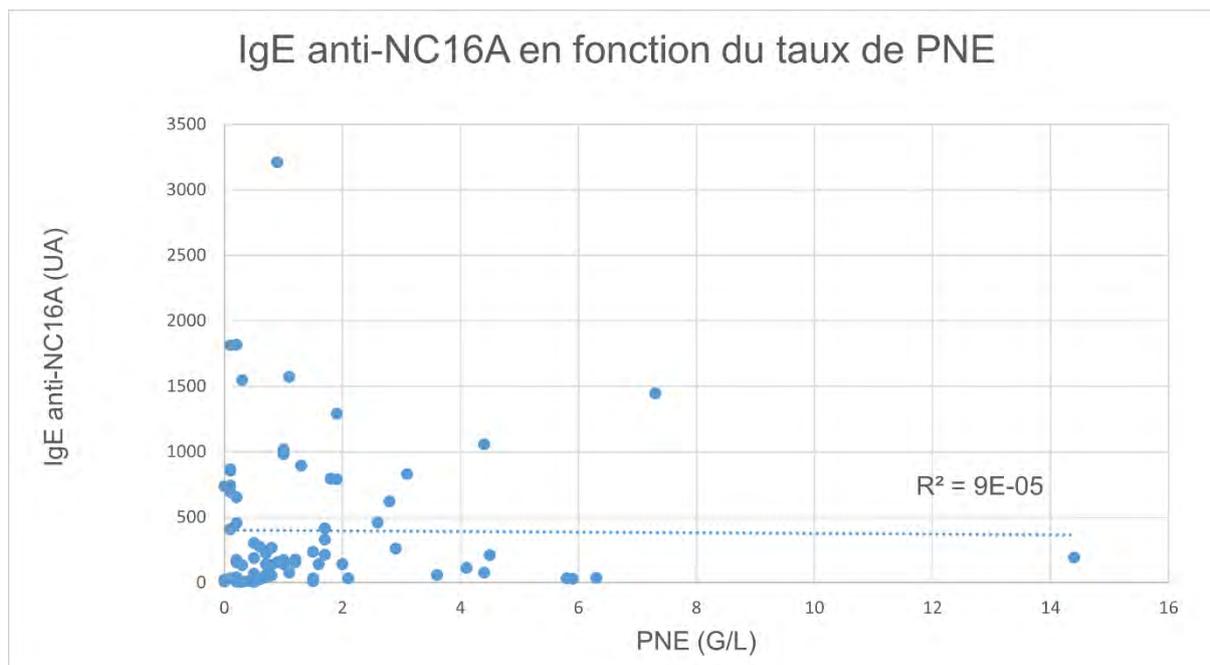


Figure 43 : Corrélation entre le taux d'IgE anti-NC16A et le taux de PNE circulants

Selon le test de corrélation de Spearman, le taux d'IgE anti-NC16A n'est pas corrélé à une élévation des PNE circulants ($r = 0,1492$; $p = 0,1866$). Il en est de même pour le test de corrélation de Pearson. La présence de PNE circulants ne présument en rien leur présence au niveau de la jonction dermo-épidermique, il est plus pertinent de s'intéresser à une éventuelle corrélation entre la présence d'IgE anti-NC16A et la présence de PNE infiltrant la bulle sous-épidermique retrouvés en anatomopathologie. 80 patients ont pu être analysés.

N = 80		Présence de PNE le long de la JDE	
		Positif	Négatif
IgE anti-NC16A	Positif	61	3
	Négatif	12	4

Tableau 11 : Répartition des patients suivant la présence de PNE le long de la jonction dermo-épidermique

Selon le test de Fisher, on considère que la présence d'IgE anti-NC16A est associée à la présence de PNE près de la jonction dermo-épidermique après analyse anatomopathologique ($p = 0,0268$).

7) Comparaison des sous-groupes en fonction des caractéristiques cliniques

a) Présence de bulles (N=86)

N = 86		Bulles	
		Présence	Absence
IgE anti-NC16A	Positif	65	4
	Négatif	12	5

Tableau 12: Répartition des patients suivant la présence de bulles sous-épidermiques

Selon le test de Fisher, on considère qu'il existe une association entre la présence de bulles et la présence d'IgE anti-NC16A ($p = 0,0131$). Ce résultat est contradictoire avec certaines données de la littérature, qui décrivent une prédominance des IgE anti-NC16A chez des patients présentant une clinique atypique (absence de bulles, ou prépondérance d'un prurit). Néanmoins, la présence de bulles fait partie des caractéristiques cliniques retrouvées chez la plupart des patients atteints de PB.

b) Phénotype pauci- ou multi-bulleux (N=66)

N = 66		Bulles	
		Pauci-bulleux	Multi-bulleux
IgE anti-NC16A	Positif	21	33
	Négatif	11	1

Tableau 13 : Répartition des patients suivant le phénotype pauci- ou multi-bulleux

Selon le test de Fisher, on considère qu'il existe une association entre un phénotype multi-bulleux et la présence d'IgE anti-NC16A ($p = 0,0010$). Ce résultat est également contradictoire avec les données de la littérature, mais consistant avec un lien entre la présence de bulles et celle d'IgE anti-NC16A (cf paragraphe 7a).

c) Présence de prurit (N=86)

N = 86		Prurit	
		Présence	Absence
IgE anti-NC16A	Positif	57	12
	Négatif	11	6

Tableau 14 : Répartition des patients suivant la présence ou l'absence d'un prurit

Selon le test de Fisher, on considère qu'il n'existe pas d'association entre la présence d'IgE anti-NC16A et un phénotype particulièrement prurigineux ($p = 0,1789$). Néanmoins, la présence d'un prurit fait également partie des caractéristiques cliniques retrouvées chez la plupart des patients atteints de PB. Pour affiner ce test, il serait plus pertinent de corrélérer l'intensité du prurit, qui semble selon la littérature être plus intense chez les patients qui possèdent des IgE anti-NC16A. L'intensité du prurit est évaluée par une échelle visuelle analogique (EVA, entre 0 et 10). Elle n'est pas précisée chez un nombre suffisant de patient pour pouvoir évaluer le lien entre ce critère et la présence d'IgE anti-NC16A.

d) Intensification thérapeutique (N=86)

En l'absence de score clinique disponible chez tous les patients, nous avons approché la sévérité de la maladie avec un critère objectif : l'intensification thérapeutique. Tous les patients dont la pathologie a été contrôlée par l'emploi de corticostéroïdes par voie locale ou systémique sont considérés comme n'ayant pas nécessité d'intensification thérapeutique. Les patients ayant nécessité une intensification thérapeutique sont ceux pour lesquels l'emploi d'un autre immunosuppresseur a été requis pour obtenir un contrôle satisfaisant de la maladie (méthotrexate, rituximab, omalizumab, IVIg).

N = 86		Intensification thérapeutique	
		Oui	Non
IgE anti-NC16A	Positif	26	44
	Négatif	3	13

Tableau 15: Répartition des patients ayant nécessité une intensification thérapeutique en fonction de la présence d'IgE anti-NC16A.

Selon le test de Fisher, il n'y a pas d'association entre la présence d'IgE anti-NC16A et le recours à une immunosuppression plus importante ($p = 0,3958$).

e) Sévérité de la maladie (N = 80)

La sévérité de la maladie n'était pas décrite dans tous les courriers disponibles lors du recueil de données. D'après les données disponibles, nous avons défini une PB comme étant sévère sur la base des caractéristiques suivantes : (1) le clinicien décrit une pemphigoïde bulleuse sévère ; (2) le patient a une atteinte muqueuse ; (3) le patient avait une atteinte cutanée étendue, qui a nécessité l'usage d'immunosuppresseurs autres que la corticothérapie pour obtenir un contrôle de la maladie. Le lien entre la sévérité et la présence d'IgE anti-NC16A a été évalué selon le test de Fisher.

N = 80		Sévérité de la maladie	
		Oui	Non
IgE anti-NC16A	Positif	27	37
	Négatif	1	15

Tableau 16 : Répartition des patients suivant la présence d'IgE anti-NC16A et la sévérité de la maladie

Selon le test de Fisher, il existe un lien entre la présence d'IgE anti-NC16A et une maladie sévère ($p = 0,0074$). Ces résultats devront cependant être confirmés par une évaluation plus précise de la sévérité de la maladie.

f) Autres paramètres cliniques (N = 86)

D'autres paramètres cliniques disponibles ont été analysés, afin de rechercher une éventuelle corrélation entre la présence d'IgE anti-NC16A et d'une présentation clinique atypique. Un phénotype urticarien est décrit chez certains patients ; de même, une partie des patients présente une atteinte décrite comme « prurigo-like » ou eczématiforme ; enfin, de rares patients présentent une atteinte des muqueuses. Le test de Fisher n'a retrouvé aucun lien entre ces trois présentations cliniques atypiques et la présence d'IgE anti-NC16A (données non montrées).

Enfin, les mêmes paramètres cliniques ont été comparés à la présence ou l'absence d'IgG anti-NC16A. Les mêmes résultats ont été obtenus, à savoir un test de Fisher indiquant un lien entre la présence d'IgG anti-NC16A (quel que soit le taux) et la présence de bulles ($p = 0,013$), un phénotype multi-bulleux ($p = 0,01$) et une maladie sévère ($p = 0,0123$). Les tableaux résumant la répartition des patients suivant leurs caractéristiques cliniques et la présence d'IgG anti-NC16A sont présentés en annexe (Annexe 8).

8) Patients sous Omalizumab : Présence d'IgE anti-NC16A et efficacité thérapeutique

La série étudiée dans ce manuscrit représente, à notre connaissance, la première étude comprenant autant de patients atteints de pemphigoïde bulleuse (N = 12) dont les taux circulants d'IgE anti-NC16A ont été dosés avant et éventuellement après traitement par Xolair (= omalizumab). La figure 44 résume les résultats de cette série, en termes de taux d'IgE anti-NC16A, d'IgE totales et de succès ou d'échec thérapeutique.

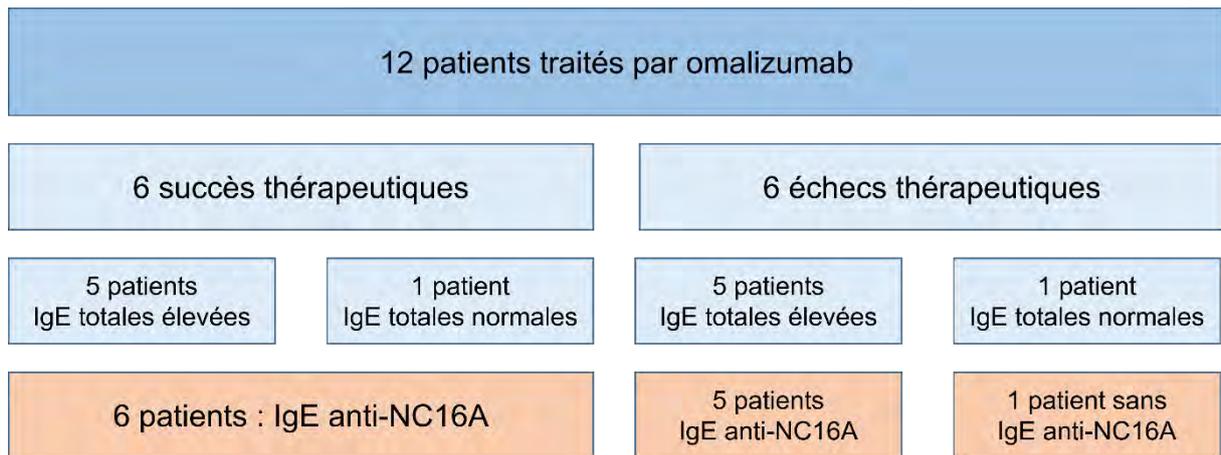


Figure 44 : Résumé des caractéristiques des patients traités par Omalizumab : positivité des IgE anti-NC16A et réponse thérapeutique au Xolair

Les données biologiques (taux d'IgE totales et taux d'IgE anti-NC16A) et cliniques (date du début du traitement et efficacité thérapeutique) des patients traités par omalizumab sont présentées en annexe 9. Les taux d'IgE anti-NC16A sont représentés sur la Figure 45 en fonction de l'initiation du traitement par omalizumab. Les patients répondeurs et non répondeurs sont indiqués par des points de couleurs différentes.

Evolution du taux d'IgE anti-NC16A
chez les patients traités par omalizumab

n = 12 patients

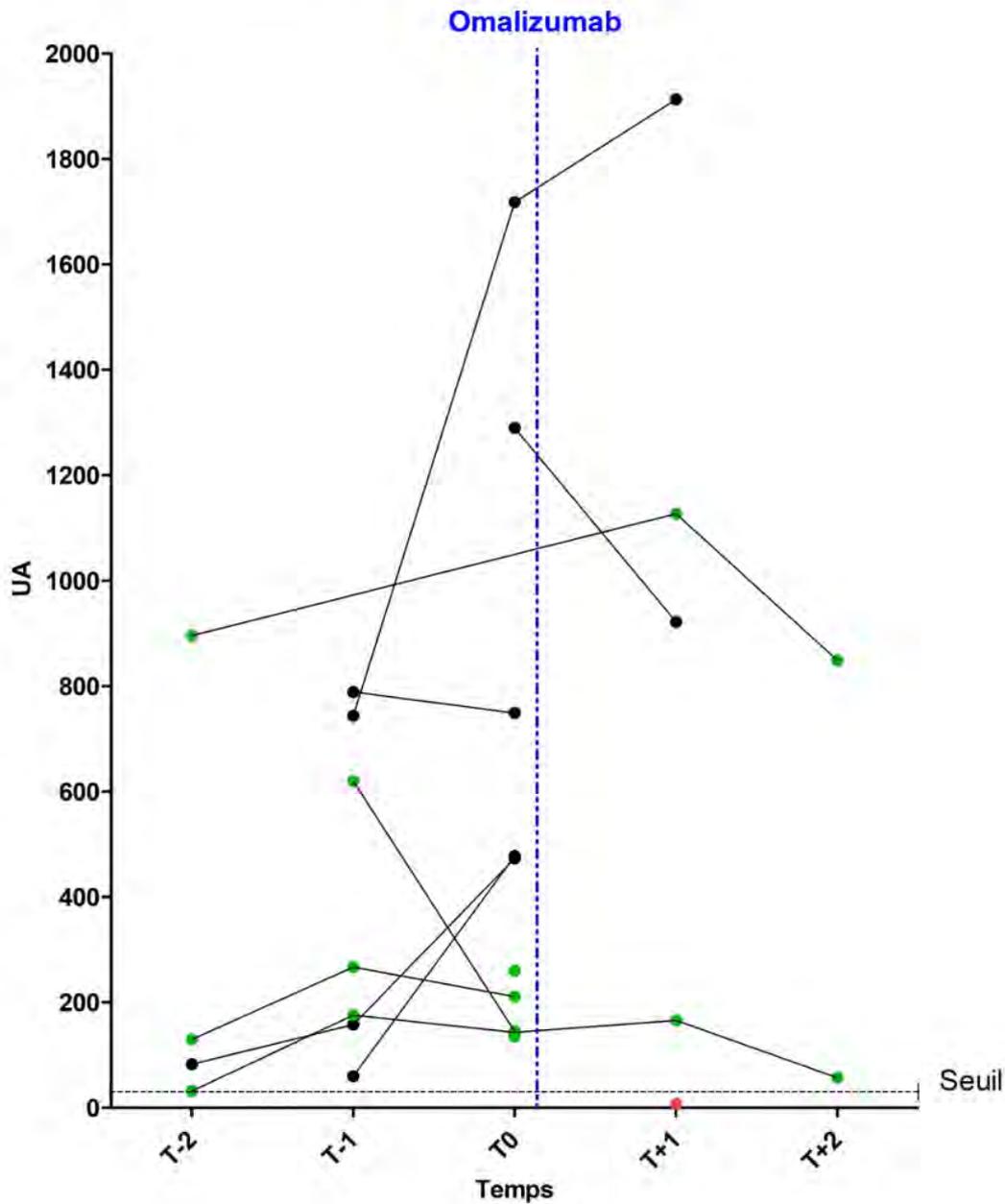


Figure 45 : Evolution du taux d'IgE anti-NC16A en fonction de la mise sous omalizumab chez N = 12 patients. La droite verticale bleue indique le moment de l'introduction de l'omalizumab. Le seuil est indiqué en pointillé. Les points verts correspondent aux patients traités avec succès. Les points noirs représentent les patients pour lesquels l'omalizumab n'a pas eu d'efficacité. Le point rouge indique le seul patient négatif en IgE anti-NC16A dans cette série, et pour lequel le traitement n'a pas eu d'efficacité.

Il semble que la présence d'anticorps d'isotype IgE dirigés contre le domaine NC16A de la BP180 ne permet pas de préjuger de l'efficacité de l'omalizumab. Les six patients traités avec succès par omalizumab (points verts) possèdent tous des IgE anti-NC16A, à des taux variables. Pour cinq des patients traités, aucune efficacité thérapeutique

n'a été constatée malgré la présence d'IgE anti-NC6A (points noirs), parfois avec des taux élevés.

La distinction des patients ne peut pas non plus se faire sur le taux d'IgE anti-NC16A : les taux les plus élevés ne sont pas forcément retrouvés chez les patients répondeurs. Les taux les plus faibles d'IgE anti-NC16A ne sont pas non plus retrouvés chez les patients non répondeurs.

Un seul patient traité par omalizumab n'avait en fait aucune IgE spécifique du domaine NC16A, et chez ce patient le traitement a été arrêté faute d'efficacité (point rouge). Avec un seul patient dans ce cas, ce résultat ne permet pas de conclure quant à une absence d'efficacité de l'omalizumab lors de l'absence d'IgE anti-NC16A.

Globalement, on constate que les taux d'IgE anti-NC16A évoluent relativement peu chez chaque patient, et ce en dépit de l'introduction de l'omalizumab. Ce constat n'est pas surprenant, en raison du mécanisme d'action de cet anticorps monoclonal thérapeutique, qui complexe les IgE et augmente leur demi-vie dans le sang circulant (186). Au cours de notre étude, nous avons à plusieurs reprises dosé les IgE anti-NC16A sur plusieurs sérums d'un même patient, prélevés à différents temps. Chez ces patients, en dehors de tout traitement par omalizumab, nous avons constaté le même phénomène que celui décrit avec les 12 patients ci-dessus, à savoir que le taux d'IgE anti-NC16A varie peu chez un même patient (données non montrées ici).

Comme nous l'avons montré avec l'étude d'une population de 87 individus atteints de pemphigoïde bulleuse, la présence d'IgE anti-NC16A est en fait relativement fréquente (80% des patients). Il n'est donc pas étonnant de trouver un grand nombre de patients positifs en IgE anti-NC16A chez ces patients traités par omalizumab. La prescription d'omalizumab a été effectuée en se basant sur des données cliniques (forme particulièrement prurigineuse et/ou érythémateuse, résistance aux traitements) et biologiques (taux d'IgE totales élevées). Le taux d'efficacité de l'omalizumab est dans cette petite cohorte de 50%. Le nombre de patients n'est pas assez élevé pour permettre de suggérer une conclusion quant à l'efficacité du traitement et la présence d'IgE anti-NC16A, même s'il semble que le seul critère d'une présence d'IgE anti-NC16A ne garantisse pas un succès thérapeutique de l'omalizumab.

En conclusion, nous avons mis au point au laboratoire un test d'identification permettant le dosage des IgE spécifiques du domaine NC16A de la BP180. Lors de la mise au point nous avons noté que l'ajout d'EDTA dans le tampon de dilution sensibilise le test et révèle la présence d'IgE anti-NC16A chez certains patients considérés jusque-là comme négatifs. Nous avons constaté qu'un grand nombre de patients possèdent de tels auto-anticorps. Il reste cependant difficile de déterminer si la présence d'IgE anti-NC16A est rattachée à une présentation clinique particulière, à un devenir ou une sévérité de la pathologie, ou à l'efficacité thérapeutique de l'anti-IgE thérapeutique, l'omalizumab. Ce travail est actuellement poursuivi au laboratoire d'immunologie de façon prospective : les IgE anti-NC16A sont dosées chez tous les

nouveaux patients PB, afin de connaître leur taux au diagnostic et de surveiller une éventuelle modification de leur taux au décours de la maladie. La constitution d'une cohorte de patients PB suivie dans le temps permettra également d'évaluer si certaines caractéristiques cliniques peuvent être reliées à la présence ou à l'évolution du taux d'IgE anti-NC16A.

Partie IV : Discussion

Concernant la **détection d'auto-anticorps ciblant d'autres épitopes que le domaine NC16A, et notamment LAD1 et LABD97**, plusieurs conclusions peuvent être tirées après la mise au point de la technique par PAGE-SDS et de Western blot, et l'analyse des résultats obtenus.

Tout d'abord, la lignée immortalisée de kératinocytes humains NTERT permet bien d'obtenir les antigènes d'intérêt, LAD-1 et LABD97. Il est toutefois nécessaire, pour obtenir des quantités suffisantes des produits de dégradation, de réaliser une digestion enzymatique par la plasmine (idéalement, 20 minutes avec 0,1 U/mL), et de concentrer les surnageants de culture.

Dans notre population de contrôles sains, la révélation d'une protéine migrant à 120 kDa chez un individu suggère que d'autres protéines que LAD-1, présentes dans le surnageant et migrant au poids moléculaire apparent de 120 kDa, peuvent être reconnues par les anticorps circulants. Pour ce patient, aucun marquage n'a été observé en IFI sur peau clivée, ce qui semble exclure la présence d'anticorps anti-LAD-1 dans ce sérum. Cette dernière donnée démontre parfaitement une des limites de la technique utilisée : la révélation d'une bande migrant à une taille précise peut correspondre à la reconnaissance de plusieurs protéines. En l'absence de technique d'identification, on ne peut affirmer que les protéines révélées à ce poids moléculaire apparent sont bel et bien la protéine LAD-1. Toutefois, la plupart des patients souffrant de PB et reconnaissant une protéine migrant à 120 kDa, possède également des anti-NC16A en ELISA et des anticorps marquant la membrane basale dermo-épidermique en IFI. Cela suggère que ces patients possèdent des auto-anticorps dirigés contre une ou plusieurs protéines de la jonction. On peut donc émettre l'hypothèse que ces patients possèdent des anticorps anti-LAD-1. Néanmoins, il sera nécessaire à l'avenir de confirmer toute positivité en Western blot de cette bande détectée à 120 kDa, par IFI sur peau clivée.

Dans la population de patients atteints de pemphigoïde bulleuse en l'absence de tout traitement par anti-PD-1 ou PD-L1, on constate que le taux de positivité pour la protéine migrant 120 kDa est faible. Pour l'un des deux patients, la positivité de cette bande présente un intérêt, en l'absence d'IgG anti-NC16A et donc de cible identifiée jusqu'alors. Concernant les patients atteints de PB suite à un traitement par anti-PD-1 ou anti-PD-L1, ils présentent un taux de positivité en ELISA IgG NC16A proche de 60% selon la littérature (162). Or c'est dans cette population que nous avons retrouvé le taux le plus important de bande positive à 120 kDa. Ces données démontrent bien que la technique de Western blot développée présente un intérêt chez les patients atteints de PB « ELISA IgG NC16A négatifs ».

73% des sérums provenant de patients ayant développé une pemphigoïde bulleuse dite « immuno-induite » reconnaissent une protéine migrant à 120 kDa, contenue dans le surnageant de culture des kératinocytes. Seulement 9% des patients dans le groupe contrôle, et 18% chez les patients traités par anti-PD-1 et chez les patients atteints de PB possèdent des anticorps reconnaissant une protéine migrant à 120 kDa. La réactivité contre la protéine LAD-1 est donc retrouvée plus fréquemment dans la

population de patients PB traités par anti-PD-1 ou anti-PD-L1, que dans les autres populations. Nos résultats sont donc en accord avec la littérature, et permettent de renforcer l'hypothèse du développement d'une variante de pemphigoïde bulleuse, dite « LAD-1 positive », après traitement par anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (25,187).

Pour continuer à étudier l'apparition d'auto-anticorps anti-LAD-1 et le développement d'une PB chez les patients traités par anti-PD-1 ou anti-PD-L1, il faut envisager une étude clinique prospective et plus exhaustive. La constitution et l'analyse de bio-banques permettrait, en cas d'apparition d'une PB sous anti-PD-1, de rechercher la présence éventuelle d'anticorps anti-LAD-1 avant l'instauration du traitement, ou avant l'apparition des signes cliniques de PB. Il semble pertinent de déterminer si de tels auto-anticorps précèdent l'instauration de l'immunothérapie ou si c'est le traitement qui induit l'apparition des auto-anticorps, puis de la pathologie auto-immune. Cette information permettrait, le cas échéant, de prédire le développement d'une PB en cas de préexistence des anticorps anti-LAD-1, et d'adapter la prise en charge du patient et les doses d'anti-PD-1 délivrées. Cette question reste un défi important, dans le contexte d'une utilisation des inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire dans un nombre d'indication croissantes en oncologie. Des cas de PB ont récemment été rapportés à la suite d'un traitement par un anticorps thérapeutique ciblant le TGF β (188). Un nouveau traitement, employé dans le cancer du rein, le bintrafusp α , est un anticorps bi-spécifique ciblant PD-L1 et la forme soluble du TGF β . Un premier cas de PB après l'instauration de ce traitement a été rapporté (189).

Concernant l'analyse des patients atteints de DIGAL, plusieurs conclusions peuvent également être tirées. Tout d'abord, nous avons augmenté l'intensité des bandes obtenues, et donc amélioré la sensibilité du test, en augmentant la concentration de l'anticorps anti-IgA couplé à la phosphatase alcaline. Cela a permis de contrôler sur une seconde expérience la présence d'une réactivité pour une protéine migrant à environ 95 kDa pour un des sérums. Seul un patient dont le diagnostic de DIGAL avait été retenu possédait des anticorps anti-LABD97. Malgré la rareté de la pathologie, le taux de positivité aurait dû être plus élevé (181). Plusieurs explications sont envisageables : (1) une erreur diagnostique, malgré une clinique évocatrice, et en l'absence d'autre test disponible actuellement afin d'identifier la cible antigénique, (2) un manque de sensibilité de la technique, (3) la perte d'un épitope reconnu lors de la digestion enzymatique par la plasmine.

Ce dernier point permet d'évoquer les perspectives du développement de ce test. Actuellement d'autres sources antigéniques sont analysées. Nous avons déterminé la combinaison optimale entre concentration de la plasmine et durée d'incubation pour obtenir un surnageant contenant les deux peptides (LAD-1 et LABD97). En concentrant le surnageant de façon plus importante (30X environ, au lieu de 10X) il sera désormais possible de déterminer, avec une bonne sensibilité, des profils de patients réagissant avec l'un, l'autre, ou les deux produits de clivage de la BP180. Plusieurs équipes ont étudié le profil de réactivité de patients atteints de PB et ont suggéré que la reconnaissance simultanée des domaines C-terminaux et NC16A était associée à une forme clinique plus sévère et une atteinte des muqueuses (23,93,115). Nous ne possédons pas de fragments recombinants de la BP180 permettant d'étudier la réactivité vis-à-vis des différents domaines de la protéine. Toutefois, l'étude du profil

de réactivité vis-à-vis des fragments LAD-1 et LABD97 serait intéressante pour distinguer des auto-anticorps capables de reconnaître spécifiquement la partie C-terminale de la BP180, présente seulement sur le fragment LAD-1.

En ce qui concerne **la détection et le dosage des IgE circulantes anti-NC16A dans le sérum de patients atteints de PB**, plusieurs conclusions peuvent également être tirées.

Dans un premier temps, nous avons développé un test original, très sensible, permettant grâce au système « biotine – streptavidine » la détection de faibles taux d'IgE capables de reconnaître le domaine NC16A. Chez des patients possédant souvent au diagnostic de forts taux d'anticorps d'isotype IgG spécifiques de la même cible, il était légitime d'envisager une compétition pour la cible antigénique, et une absence de détection des IgE chez certains patients. Cet artefact avait été envisagé par plusieurs auteurs, et vérifié par l'incubation préalable des sérums sur des puits ou des colonnes portant la protéine A (137) ou la protéine G (12,140). D'après leurs résultats, les valeurs obtenues après déplétion ne sont pas modifiées. Dans notre étude, les résultats obtenus après déplétion des IgG indique qu'une part importante des IgE sont perdues au décours de l'adsorption des IgG. Ces données suggèrent l'existence de complexes immuns IgG – IgE (190–192). La présence de ces complexes immuns dans le contexte de la pemphigoïde bulleuse n'a pas été décrite à notre connaissance, et mérite d'être étudiée de façon plus approfondie. Dans notre pratique, nous avons choisi de ne pas déléter les IgG, afin de ne pas risquer de perdre des IgE spécifiques du domaine NC16A et de rendre des résultats faussement négatifs.

Par ailleurs, la présence de cibles antigéniques très rapprochées, comme c'est le cas dans les puits utilisés dans ce test (tétramère du domaine antigénique NC16A) peut être à l'origine d'un autre artefact : l'activation du complément et un encombrement stérique des IgG potentialisé par le dépôt des fragments de C1q. Pour étudier l'influence de phénomène, nous avons incubé les sérums des patients en présence d'EDTA, chélateur des ions calcium. La comparaison des résultats obtenus avant et après l'usage d'EDTA confirme que, chez certains patients, les taux dosés étaient sous-estimés, voire non détectés en l'absence d'EDTA. La plupart des patients présentaient un taux élevé d'IgG anti-NC16A. Pourtant, les IgE anti-NC16A étaient tout de même détectées chez de nombreux patients malgré l'absence d'EDTA. Nous savons que les patients atteints de PB peuvent posséder différentes sous-classes d'IgG anti-NC16A, essentiellement des IgG1 et des IgG4 (125). Nous pouvons émettre l'hypothèse que, chez certains patients, le recrutement du complément n'a pas lieu dans les puits recouverts de l'antigène. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les IgG présentes chez ces patients étaient des IgG4. Ces dernières n'activant pas le complément, la détection des IgE anti-NC16A a pu se faire sans encombre. En revanche, les patients pour lesquels l'ajout d'EDTA positivait le test pourraient posséder des IgG1, capables de recruter le complément. Cette hypothèse devra être confirmée par la caractérisation de la sous-classe des IgG anti-NC16A détectées.

L'absence de corrélation entre le taux d'IgE totales et le taux d'IgE anti-NC16A indique une bonne spécificité du test. Cependant, pour un petit nombre des sérums analysés on suspecte une fixation non spécifique des IgE sur la surface du polystyrène. Pour évaluer l'hypothèse d'une fixation non spécifique des IgE sur le polystyrène de la plaque en présence d'un taux d'IgE totales très élevé, nous avons calculé le ratio de

la valeur du signal obtenu en ELISA IgE anti-NC16A par rapport au taux d'IgE totales. Lorsque les taux d'IgE sont très élevés, on observe, pour certains patients, que le signal mesuré en ELISA IgE anti-NC16A semble proportionnelle au taux d'IgE totales. Une partie du signal mesuré pourrait donc être non spécifique, dû à l'adsorption des IgE totales sur les puits, lorsque les taux d'IgE sont vraiment très élevés. Ce phénomène n'est en effet observé que pour des sérums où le taux d'IgE total est supérieur à 1000 kU/L. Cela explique pourquoi il n'a pas été constaté lors de l'analyse des sérums de contrôles sains : les taux d'IgE totales, même élevés au-delà de la moyenne, restent inférieurs à 1000 kU/L. Pour éviter cet artefact, nous avons d'ores et déjà imposé dans notre protocole des étapes de lavage intenses (trois lavages à chaque série, avec une étape de séchage des puits par retournement après chaque série de lavages). Lors de futures expériences nous pourrions augmenter le nombre ou l'intensité des lavages, et étudier l'effet sur le signal observé. Enfin, nous pouvons également étudier le signal obtenu en ELISA IgE anti-NC16A par des sérums de patients contenant de forts taux d'IgE totales, supérieurs à 1000 kU/L, mais à priori sans IgE anti-NC16A car provenant de patients exempts de PB. Des patients souffrant de maladies allergiques seraient la population adaptée. Le signal obtenu en ELISA IgE anti-NC16A sera analysé en fonction du taux d'IgE totales, afin de vérifier si le taux d'IgE anti-NC16A peut être surestimé chez certains patients.

La proportion de patients positifs en IgE anti-NC16A est plus importante que celle attendue par rapport à la plupart des données de la littérature (5,6). Cela peut être expliqué par une sensibilité accrue du test et à l'ajout d'EDTA, permettant de détecter de faibles taux d'IgE circulants. Une étude comprenant 117 patients (138) retrouvait un pourcentage plus faible de patients positifs en IgE anti-NC16A (environ 40%). Plusieurs auteurs décrivaient un lien entre la présence d'IgE anti-NC16A et une maladie plus sévère (5,151). D'autres études n'ont pas retrouvé cette association (12,140). Après analyse des données obtenues, nous avons constaté qu'il semble exister un lien entre une maladie plus sévère et la présence d'IgE anti-NC16A. Ce lien a également été retrouvé avec la présence d'IgG anti-NC16A. Cette information rappelle la corrélation bien décrite entre les IgG anti-NC16A et l'activité de la maladie.

Une analyse récente des données de la littérature relève les contradictions de plusieurs études quant à un lien éventuel entre certaines présentations cliniques et la présence d'IgE anti-NC16A (132). Dans cette analyse, un lien entre la présence d'IgE anti-NC16A et une présentation clinique particulière est affirmé dans cinq études, mais n'a pas été retrouvé dans cinq autres études. Il apparaît dans notre étude que le taux des IgG et des IgE anti-NC16A n'est pas corrélé à une forme clinique particulière. La présence de bulles et un phénotype multi-bulleux sont les seuls critères cliniques associés à la présence d'IgG et d'IgE anti-NC16A. Cela peut s'expliquer par un fort taux de positivité du test : 80% des patients possèdent des anticorps d'isotype IgE, et il paraît donc difficile d'y rattacher une présentation clinique particulière.

Il est important de noter la limite principale de ce test, identique à celle du test commercial. La recherche ciblée des IgG circulantes spécifiques du domaine NC16A de la BP180 ne permet pas de conclure quant à la présence d'anticorps capables de reconnaître d'autres épitopes de la BP180. Dans la littérature, la recherche des IgE anti-BP180 est essentiellement réalisée par des tests ELISA, qui détectent des IgE capables de reconnaître le domaine NC16A de la protéine. Notre étude a également

utilisé un système permettant la détection d'IgE anti-NC16A. Nos données peuvent ainsi être comparées à celles de la littérature. Le domaine NC16A contient les épitopes majeurs reconnus par les anticorps contenus dans le sérum de patients atteints de PB. Le taux circulant des IgG anti-NC16A a été corrélé à l'activité de la maladie. Il reste encore à déterminer si c'est également le cas pour les anticorps d'isotype IgE.

Les IgE sont essentiellement retrouvées dans les tissus. Ils peuvent se fixer sur les récepteurs Fc ϵ des PNE et des mastocytes, et sont alors impossibles à détecter par l'étude du sérum. La mise en évidence d'IgE en IFD démontre qu'une partie des auto-anticorps de classe IgE est d'ores et déjà fixée au niveau tissulaire, soit le long de la JDE, soit à la surface de cellules localisées près de la jonction. Bien que les données obtenues au laboratoire semblent indiquer que très peu d'IgE sont fixées le long de la JDE, il faut imaginer que la petite surface analysée en IFD ne représente qu'une infime partie de la surface globale capable d'adsorber ces auto-anticorps. L'observation d'un marquage de cellules dermiques proche de la membrane dans notre étude est en accord avec une littérature récente, qui décrit la colocalisation des récepteurs Fc ϵ et des IgE déposées dans les tissus de patients atteints de PB (143,145). Ces données sont en faveur d'un mécanisme physiopathologique impliquant les IgE et les PNE, et non les IgG, l'activation du complément et le recrutement de PNN.

Concernant les IgE anti-NC16A dosées par ELISA et l'efficacité de l'omalizumab, nos résultats doivent être considérés avec prudence du fait du faible nombre de patients inclus. Une étude semble suggérer que le mécanisme physiopathologique impliquant les IgE pourrait impliquer les PNE : l'instauration de l'omalizumab provoque une diminution de l'expression des RFc ϵ au niveau tissulaire (193). Ce mécanisme suggère à nouveau un rôle propre des IgE anti-NC16A dans la PB. Dans notre étude cependant, la présence d'IgE anti-NC16A, ou un taux élevé d'IgE anti-NC16A, ne semblent pas présumer d'une efficacité de l'omalizumab. Le suivi des IgE anti-NC16A après l'instauration du traitement ne présente pas non plus d'intérêt : les IgE sont retenues dans le sang circulant, complexées à l'anticorps thérapeutique, et l'on retrouve des taux similaires d'IgE totales et d'IgE spécifiques de la cible sur les prélèvements effectués après le début du traitement (186). Il est important de noter que pendant la rédaction de ce manuscrit, deux patientes atteintes de pemphigoïde gestationnelle (PG) ont été traitées par omalizumab. Elles ne possèdent pas d'IgE anti-NC16A détectés par notre test ELISA, pourtant elles ont été traitées avec succès (données non montrées). Ce résultat suggère qu'il est impossible de conclure quant à l'efficacité de l'omalizumab en fonction de la présence d'IgE anti-NC16A. Soit le test développé n'est pas assez sensible, et les deux patientes ont en réalité des auto-anticorps d'isotype IgE dirigés contre le domaine NC16A. Soit les IgE pathogènes dans la PB (et dans la PG) sont spécifiques d'autres épitopes que le domaine NC16A, et dans ce cas il faudrait les rechercher par d'autres techniques (Western blot, ELISA avec d'autres fragments de la BP180). Soit comme évoqué plus haut, la présence ou l'absence d'IgE anti-NC16A circulantes n'est pas un bon indicateur. Les IgE spécifiques peuvent être intégralement fixées sur leur cible, ou sur les récepteurs aux fragments Fc ϵ , et ne pas être détectés dans le sang circulant.

Il paraît important de déterminer le rôle des IgE et des PNE dans la PB. Depuis de nombreuses années, la PB est assimilée comme étant une maladie auto-immune où l'activation du système immunitaire est mixte : « Th1/Th2 ». On retrouve en effet chez

les patients atteints de PB des cytokines pro-inflammatoires et des cellules caractéristiques d'une réponse Th1 (IFN γ , cytotoxicité) mais également Th2 (IL-4, PNE) (194). Les arguments en faveur d'une composante Th2 dans la PB sont la présence d'IL-4 dans le sérum (195) et la présence d'éotaxine dans le sérum (196) et les bulles des patients (197). Dans ce contexte, plusieurs molécules s'opposant aux mécanismes dits « Th2 » sont envisagées dans la PB. L'omalizumab a été développée initialement pour le traitement de l'asthme sévère, une maladie où la composante Th2 est bien décrite (198). Nous avons déjà vu qu'il est utilisé dans le traitement de la PB. D'autres anticorps monoclonaux thérapeutiques sont développés, pour s'opposer au développement d'une réponse Th2 et au recrutement des PNE. De rares succès thérapeutiques ont été rapportés après le traitement de patients atteints de PB par dupilumab, un anticorps anti-IL-4 et IL-13 (199,200). De petites séries semblent suggérer une certaine efficacité de ce traitement (201). De même, un traitement anti-IL-5 est en cours de développement (9) et son utilisation est envisagée chez des patients souffrant de PB et résistants aux thérapeutiques classiques. Il est donc nécessaire de déterminer le lien existant entre ces mécanismes physiopathologiques et une efficacité de ces traitements.

Finalement, ce travail a permis d'évaluer l'intérêt de la recherche des IgE anti-NC16A. D'une part, la présence d'IgE anti-NC16A ne présente qu'un intérêt limité pour poser le diagnostic de PB. La clinique, l'immunofluorescence directe et l'anatomopathologie sont les pierres angulaires du diagnostic. Les IgG anti-NC16A confirment le diagnostic, mais prennent toute leur place dans le suivi et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et du risque de rechute. Les IgE anti-NC16A pourraient également varier en fonction de l'activité de la maladie, selon la littérature et les résultats de notre étude. Dans ce cas, elles n'apportent pas de plus-value au dosage des IgG anti-NC16A. Dans le cas particulier de patients traités par omalizumab, on pourrait envisager qu'un traitement ciblant les IgE aurait une efficacité plus importante chez les patients présentant un taux d'IgE anti-NC16A élevé. Mais la présence ou l'absence d'IgE anti-NC16A n'est apparemment pas prédictive de l'efficacité thérapeutique de ce traitement. Ce travail permet d'envisager un projet prospectif, où les biopsies de patients au moment du diagnostic seront analysées en IFD avec des anticorps anti-IgE, un anti-IgG1 et un anti-IgG4, et où les anticorps circulants IgE, IgG1 et IgG4 anti-NC16A seront dosés par ELISA. L'étude seule des taux circulants d'IgE anti-NC16A ne peut visiblement pas apporter d'explication claire quant aux mécanismes physiopathologiques sous-jacents dans la PB. La diversité de la clinique et des profils d'auto-anticorps dans la PB suggère néanmoins que plusieurs mécanismes sont à l'œuvre. L'objectif de ce projet sera de recueillir les données cliniques des patients atteints de PB, de classer les patients en fonction de leur profil d'auto-anticorps (prédominance des IgG1, des IgG4 +/- des IgE) et de rechercher un éventuel lien entre leur présentation clinique et leur profil immunologique. Enfin, la recherche d'IgE anti-BP230 semble être un paramètre intéressant. Dans plusieurs études, des IgE anti-BP230 ont été retrouvées chez un nombre important de patients (11,153). Les données concernant ce type d'anticorps sont également contradictoires : certains auteurs rattachent leur présence à une forme

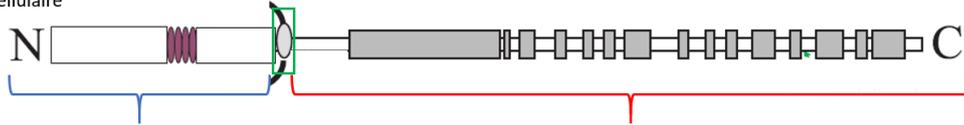
clinique résistante, ou au contraire ne trouve aucun lien avec l'activité de la maladie (17,132).

Annexes

Annexe 1 : La séquence protéique de la BP180 domaine par domaine

Découpage BP180 en domaines

- Intracellulaire
- Transmembranaire
- Extracellulaire



Domaine intracellulaire :

AA 1 à 467

```
MDVTKKNKRDGTEVTERIVTETVTRRLTSLPPKGGTSNGYAKTASLGGSRLEKQSLTHG
SSGYINSTGSTRGHASTSSYRRAHSPASTLPNSPGSTFERKTHVTRHAYEGSSSGNSPE
YPRKEFASSTRGRSQTRESEIRVRLQSASPSTRWTELDVVKRLKGRSASVSPTRNSS
NTLPIPKKGTVETKIVTASSQSVSGTYDATILLDANLP SHVWSSTLPAGSSMGTYHNNMTT
QSSLLNTNAYSAGSVFVFNMASCPTLHPGLSTSSSVFGMQNNLAPSLTTLSHGTTT
TSTAYGVKKNMPQSPAAVNTGVSTSAACTTSVQSDDLLHKDCKFLILEKDNTPAKKEMEL
LIMTKDSGKVF TASPASIAATSFSEDTLKKKEQAAYNADSGLKAANGDLKTVSTKGKTT
TADIHSYSGSGGGSGGGGGVGGAGGGPWGPAPAWCPGSCCSWWKW
```

Domaine transmembranaire

AA 468 à 488

```
-----LLGLLLTWLLLLG
LLFGLIAL
```

Domaine extracellulaire

AA 489 à 1497

```
-----AEEVRKLRVDELERIRRSILPYGDSMDRIEKDRLQGMAPAAGADLDKIGL
HSDSQEELWMMFVRKLLMMEQENLNRGSPGPKGDMGSPGPKGDRFPFPGIPGLGHPG
PQGPKGQKGSVGDPMGEGPMQREGPMGRGEAGPPGSGEKGERGAAGEPGHPGPGV
PGSVGPKGSSGSPGPPGVLQGLRGEVGLPCVKGDGPMGPPGPKGDQGEKGRGL
TGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGAPAGPDGHQPRGEQGLTGMPGIRGPPGSDGPKPGL
TGPQGPQLPGTPGRPGIKGEPGAPGKI V TSEGSMMLTVPPGPPGAMGPPGPPGAPG
AGPAGLPGHQEVNLNLQGGPPGPRGPPGPSIPGPPGPRGPPGELGPPGPPGFSLSNS
ETFLSGPPGPPGPKGDQGGPPRGHQGEQGLPGFSTSGSSSFLNLQGGPPGPPGQ
PKGDKDPGVPGALGIPSGPSEGGSSSTMYVSGPPGPPGPPGPGSISSSQEIQQYISE
YMQSDSIRSLSGVQGGPPGPPGPPVTITGETFDYSELASHVVSYLRTSGYGVSLFSS
SISSEDI L AVLQRDDVRQYLRQYLMGPRGPPGPPGASGDGSLSLDYAELSSRILSYMSS
SGISIGLPGPPGPPGTPGTSYEELLSLLRGSEFRGIVGPPGPPGPPGIPGNVWSSISVED
LSSYLHTAGLSFIPGPPGPPGPRGPPGVS GALATYAAENSDSFRSELSYLTSPDVR
SFIVGPPGPPGPPGPPGDSRLLSTDASHSRGSSSSSHSSSVRRGSSYSMSMTGGGGAGS
LGAGGAFGEAAGDRGPYGTDIGPGGGYAAAEGMYAGNGLLGADDFAGDLDYNE LAVRV
SESMQRQGLLQGMAYTVQGGPPGPPGPPGISKVFSAYSNVTADLMDFFQTYGAIQGGP
GQKGE MGT PGPKGDRGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDQVYAGRRRRRSIAVKP
```

BP180 humaine complète format EMBOSS : Collagène XVII (COL17A1)
60 AA par ligne ; AA de 1 à 1497

>COL17A1
MDVTKKNKRDGTEVTERIVTETVTTRLTSLPPKGGTSNGYAKTASLGGGSRLKQSLTHG
SSGYINSTGSTRGHASTSSYRRAHSPASTLPNSPGSTFERKTHVTRHAYEGSSSGNSSPE
YPRKEFASSSTRGRSQTRESEIRVRLQSASPSTRWTELDVVKRLLKGSRSASVSPTRNSS
NTLPIPKKGTVETKIVTASSQSVSGTYDATILDANLPSHVWSSTLPAGSSMGTYHNNMTT
QSSLLNTNAYSAGSVFGVPNNMASCPTLHPGLSTSSSVFGMQNNLAPSLTTL SHGTTT
TSTAYGVKKNMPQSPAAVNTGVSTSAACTTSVQSDDLLHKDCKFLILEKDNTPAKKEMEL
LIMTKDSGKVFTASPASIAATSFSEDTLKKEKQAAYNADSGLKAANGDLKTVSTKGKTT
TADIHSYGSSGGGGGGGGVGGAGGGPWGPAPAWPCGSCCSWWKWLGLLLTWLLLLG
LLFGLIALAEVVRKLRVDELERIRRSILPYGDSMDRIEKDRLQGMAPAAGADLDKIGL
HSDSQEELWMFVRKLLMMEQENGLRGSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPIPGPLGHPG
PQGPKGQKGSVGDPMGPMGQREGPMGPRGEAGPPGSGEKGERGAAGEPGPHGPPGV
PGSVGPKGSSGSPGPPGVLQGLRGEVGLPGVKGDGPMGPPGPKGDQGEKGRGL
TGEPMRGLPGAVGEPGAKGAMGPAGPDGHQGRGEQGLTGMPGIRGPPGPSGDPGKPG
TGPQGPQGLPGTPGRPGIKGEPGAPKIVTSEGSSMLTVPGPPGPPGAMGPPGPPGAPG
AGPAGLPGHQEVLNLQGGPPGPPGPRGPPGPSIPGPPGPRGPPGEGPLPGPPGPPGSFLSNS
ETFLSGPPGPPGPPGPKGDQGGPPGPRGHQGEQGLPGFSTSGSSSFGLNLQGGPPGPPGQ
PKGDKGDPGVPALGIPSGPSEGGSSSTMYVSGPPGPPGPPGPPGSISSSGQEIQQYISE
YMQSDSIRS YLSGVQGGPPGPPGPPVTTITGETFDYSELASHVVSYLRTSGYGVSLFSS
SISSEDI LAVLQRDDVRQYLRQYLMGPRGPPGPPGASGDGSLLSLDYAELSSRILSYMSS
SGISIGLPGPPGPPGLPGTSEYELLSLLRGSEFRGIVGPPGPPGPPGIPGNVWSSISVED
LSSYLHTAGLSFIPGPPGPPGPPGPRGPPGVSGALATYAAENSDSFRSELISYLTSPDVR
SFIVGPPGPPGPPGPPGDSRLLSTDASHRGSSSSSHSSSVRRGSSYSSSMSTGGGGAGS
LGAGGAFGEAAGDRGPYGTDIGPGGYGAAAEGMYAGNGLLGADFAGDLDYNELAVRV
SESMQRQGLLQGMAYTVQGGPPGPPGPPGPI SKVFSAYSNTADLMDFFQTYGAIQGGP
GQKGEMGTPGPKGDRGPAGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDQVYAGRRRRRSIAVKP

Découpage en domaines intracellulaire, transmembranaire et extracellulaire

Domaine intracellulaire (NC16C)

AA 1 à 467

MDVTKKNKRDGTEVTERIVTETVTTRLTSLPPKGGTSNGYAKTASLGGGSRLEKQSLTHG
SSGYINSTGSTRGHASTSSYRAHSPASTLPNSPGSTFERKTHVTRHAYEGSSSGNSSPE
YPRKEFASSTRGRSQTRESEIRVRLQSASPSTRWTELDDVKRLLKGSRSASVSPTRNSS
NTLPIPKKGTVEVKIVTASSQSVSGTYDATILDANLPSHVWSSTLPAGSSMGTYHNNMTT
QSSLLNTNAYSAGSVFGVNNMASCPTLHPGLSTSSSVFGMQNNLAPSLTTLSHGTTT
TSTAYGVKKNMPQSPAAVNTGVSTSAACTTSVQSDDLLHKDCKFLILEKDNTPAKKEMEL
LIMTKDSGVFTASPASIAATSFSEDTLKKEKQAAYNADSGLKAANGDLKTVSTKGKTT
TADIHSYSSGGGGGGGGVGGAGGGPWGPAPAWPCGSCCSWWKW

Domaine transmembranaire (NC16B)

AA 468 à 488

LLFGLIAL

LLGLLLTWLLLLG

Domaine extracellulaire

AA 489 à 1497

AEEVRKLLKARVDELERIRRSILPYGDSMDRIEKDRLQGMAPAAGADLDKIGL
HSDSQEELWMFVRKKLMMEQENGNLRGSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPPTPGIPGPLGHPG
PQGPKGQKGSVGDPMEGPMQQRGREGPMGPRGEAGPPGSSEKGERGAAGEPGPHGPPGV
PGSVGPKGSSGSPGPPGPPVGLQGLRGEVGLPGVKGDGKPMGPPGPKGDQGEKGRGL
TGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPAGPDGHQGPGEQGLTGMPGIRGPPGPPSGDPGKPGP
TGPQGPQGLPGTPGRPGIKGEPGAPGKIVTSEGSSMLTVPGPPGPPGAMGPPGPPGAPGP
AGPAGLPGHQEVLNLQPPGPPGPRGPPGPPSIPGPPGPRGPPGEGLPGPPGPPGSFLSNS
ETFLSGPPGPPGPPGPKGDQPPGPRGHQGEQGLPGFSTSGSSSFGLNLQPPGPPGPPGQ
PKGDKGDPGVPALGIPSGPSEGGSSSTMYVSGPPGPPGPPGPPGSISSSQEIQQYISE
YMQSDSIRSLSGVQPPGPPGPPGPPVTITGETFDYSELASHVVSYLRTSGYGVSLFSS
SISSEDILAVLQRDDVRQYLRQYLMGPRGPPGPPGASGDGSLSLDYAELSSRILSYMSS
SGISIGLPGPPGPPGLPGTSEELLSLLRGSEFRGIVGPPGPPGPPGIPGNVWSSISVED
LSSYLHTAGLSFIPGPPGPPGPPGPRGPPGVSGALATYAAENSDFSRELISYLTSPDVR
SFIVGPPGPPGPPGPPGDSRLLSTDASHSRGSSSSSHSSSVRRGSSYSSSMSTGGGGAGS
LGAGGAFGEAAGDRGPYGTDIGPGGGYGAAEGGMYAGNGLLGADFAGDLDYNELAVRV
SESMQRQGLLQGMAYTVQPPGPPGPPGPPGISKVFSAYSNTADLMDFFQTYGAIQGPP
GQKGEMGTPGPKGDRGPAGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDQVYAGRRRRRSIAVKP

Découpage de l'ectodomaine en domaines collagéniques (C15 à C1) et non collagéniques (NC16 à NC1)

NC16(A) : AA 489 à 566

AEEVRKCLKARVDELERIRRSILPYGDSMDRIEKDRLQGMAPAAGADLDKIGL
HSDSQEELWMFVRKKLMMEQENGLR

C15 : AA 567 à 808

GSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPQGPKGQKGSVGDPMEGPMPQGRGRE
GPMGPRGEAGPPGSGEKGERGAAGEPGPHGPPGVPGSVGPKGSSGSPGPQGPVGLQG
LRGEVGLPGVKGDGKPMGPPGPKGDQGEKGRGLTGEPMRGLPGAVGEPGAKGAMGPAG
PDGHQGPGEQGLTGMPGIRGPPGPSGDPGKPLTGPQGPQGLPGTPGRPGIKGEPGAPG
KI

NC15 : AA 809 à 820

VTSEGSSMLTVP

C14 : AA 821 à 850

GPPGPPGAMGPPGPPGAPGPAGPAGLPGHQ

NC14 : 851 à 856

EVLNLQ

C13 : 857 à 896

GPPGPPGPRGPPGPSIPGPPGPRGPPGEGLPGPPGPPGSF

NC13 : 897 à 905

LSNSETFLS

C12 : 906 à 938

GPPGPPGPPGPKGDQPPGPRGHQGEQGLPGFS

NC12 : 939 à 950

TSGSSSFGLNLQ

C11 : 951 à 977

GPPGPPGPQGPKGDKGDPGVPGALGIP

NC11 : 978 à 992

SGPSEGGSSSTMYVS

C10 : 993 à 1007

GPPGPPGPPGPPGSI

NC10 : 1008 à 1032

SSSGQEIQYISEYMQSDSIRS YLS

C9 : 1033 à 1047

GVQPPGPPGPPGPPV

NC9 : 1048 à 1105

TTITGETFDYSELASHVVSYLRTSGYGVSLFSSSISSEDILAVLQRDDVRQYLRQYLM

C8 : 1106 à 1122

GPRGPPGPPGASGDGSL

NC8 : 1123 à 1145

LSLDYAELSSRILSYMSSSGISI

C7 : 1146 à 1160

GLPGPPGPPGLPGTS

NC7 : 1161 à 1174

YEELLSLLRGSEFR

C6 : 1175 à 1192

GIVGPPGPPGPPGIPGNV

NC6 : 1193 à 1214

WSSISVEDLSSYLHTAGLSFIP

C5 : 1215 à 1235

GPPGPPGPPGPRGPPGVSGAL

NC5 : 1236 à 1264

ATYAAENSDFRSELISYLTSPDVRSFIV

C4 : 1265 à 1279

GPPGPPGPQGGPPGDS

NC4 : 1280 à 1315

RLSTDASHSRGSSSSSHSSSVRRGSSYSSSMSTGG

C3 : 1316 à 1330

GGAGSLGAGGAFGEA

NC3 : 1331 à 1398

AGDRGPYGTDIGPGGGYGAAAEGGMYAGNGLLGADFAGDLDYNELAVRVSESMQRQGLL
QGMAYTVQ

C2 : 1399 à 1413

GPPGQPGPQGGPPGIS

NC2 : 1414 à 1436

KVFSAYSNVTADLMDFFQTYGAIQ

C1 : 1437 à 1483

GPPGQKGEMGTPGPKGDRGPAGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDKGQDQ

NC1 : 1484 à 1497

VYAGRRRRRSIAVKP

Annexe 2 : Variabilité du domaine NC16A entre les espèces :

Domaine NC16A : variabilité très importante (en gras)

Zone hypervariable du domaine NC16A (25 AA) (en gras souligné)

En jaune : doublons alignés mais dont les n° des AA ne correspondent pas du fait de la variabilité de la taille de la protéine

En rouge : Insertions dans la séquence par rapport à la requête (soit la BP180 de l'Homme)

En bleu : Délétions dans la séquence par rapport à la requête

- ➔ La séquence « coiled-coil » est peu variable, bien conservée dans l'évolution
 - Motif abcdefg où a et d sont hydrophobes (d = Leu)
 - Initie le repliement de la BP180 en triple hélice
 - Val 492 à Ile 505 chez l'Homme : 2 séquences heptad
 - Les hélices alpha sont situées de part et d'autre de la séquence coiled-coil

- ➔ La séquence furine « RIRR » n'est conservée que chez l'Homme et les singes (chimpanzé, bonobo, orang-outan, gorille, gibbons), elle disparaît chez toutes les autres espèces

- ➔ Sites de clivage par l'élastase neutrophile :
 - Conservation du 1^{er} site (situé dans le domaine « coiled-coil »)
 - A part chez les grands singes, pas de conservation du second site
 - Conservation du troisième site (situé sur le domaine C15)

- ➔ Sites de clivage par ADAMs :
 - Asp 514 : conservée chez 30% des espèces
 - Lys 521 : conservé chez 60% des espèces
 - Leu 524 : devient une Val chez 31 mammifères, devient une Arg chez 5 grands singes, sinon reste conservé (65% des espèces)
 - Gln 525 : conservé chez 94% des espèces
 - Gly 526 : conservé chez 95% des espèces

- ➔ AA 528 à 547 (zone primordiale pour un shedding correct) : conservée chez les grands singes, puis très forte variabilité inter espèces

Query range 9: 481 to 540

Query	481	LLFGLIALAEEVVRKLRVDELEIRIRRSILPYGDSMDRIEKDRLQGMAPAAGADLDKIGL	540
COL17A1 HOMME	481	540
AUTO-AG HOMME	516	575
COL17A1-1 HOMME	481	540
BP180 HOMME	481	540
ISO 2 CHIMPANZÉ	481 <u>M.....R.....</u>	540
ISO X1 BONOBO	481 <u>V.....M.....R.....</u>	540
GORILLE	481 <u>M.....T.....</u>	540
ORANGOUTAN	480 <u>M.....N.....</u>	539
GIBBON	481 <u>M.....Q.....P.V.....</u>T.....	540
GIBBON CENDRÉ	481 <u>F.....M.H.G.A.Q.....</u>	540
BONOBO	457 <u>V.....M.....R.....</u>	516
ISO 3 CHIMPANZÉ	481 <u>M.....R.....</u>	540
ISO 1 CHIMPANZÉ	481 <u>M.....R.....</u>	540
ISO 1 LAMANTIN	475 <u>KTKT.MIHFE.K.Q.SS.E.....V.GV.T.GIG.....</u>	534
ISO X1 PANDA	481 <u>A.....AA.QS.GGV.L.K.TVE.AS.....A.G.....GAG.L.....</u>	540
ISO X2 PANDA	477 <u>A.....AA.QS.GGV.L.K.TVE.AS.....A.G.....GAG.L.....</u>	536
ORYCTÉROPE	482 <u>D.....V.S.VIEL--N.E.SN.E.K.V.GV.TG.GTG.....</u>	539
COLUGO	484 <u>Q.G.....KMQG.MPHLEEK.E.SNTES.HSK.SD.EVE.S.....</u>	543
PUMA	482 <u>A.....A.QS.SGV.L.DEKVE.SN.....A.SV.....G.L.....</u>	541
PHOQUE	477 <u>A.....AA.QS.QSPDAA.L.KEKAE.AS.....AV.GV.....GAGRL.....</u>	536
PHOQUE-VEAU	481 <u>A.....AA.QS.DAV.L.EEKAE.AN.....AV.GV.....GAGRL.....</u>	540
LOUTRE DE MER	476 <u>A.....AA.QG.GDV.L.DQK.....AS.....L.T.GV.....AGGL.....</u>	535
RENARD	482 <u>A.....A.QS.SNV.LFKEE.Q.AN.W...E.SVE.G.S.L.....</u>	540
ISO X1 GUÉPARD	482 <u>A.....A.QS.SGV.L.DEKVE.SN.....A.GV.....G.L.....</u>	541
LYNX	482 <u>A.....A.QS.SGV.L.DEKVE.SN.....A.GV.....G.L.....</u>	541
ISO X1 LÉOPARD	482 <u>A.....A.QS.SGV.L.DEKVE.SN.....A.GV.....G.L.....</u>	541
ISO X1 CHAT	482 <u>A.....A.QS.GGV.L.DEKVE.SS.....A.GV.....G.L.....</u>	541
ELEPHANT MER	479 <u>A.....AA.QSPDAA.L.KEKAE.AS.....AV.GV.....GAGRL.....</u>	538
PHOQUE GRIS	477 <u>A.....AV.QS.DAV.L.EEKAE.AN.....AV.GV.....GAGRL.....</u>	536
ISO 1 ORANGOUTAN	480 <u>M.....N.....</u>	539
GRIZZLI	476 <u>A.....AA.QS.GGV.L.K.TVE.AS.....A.G.....GAG.L.....</u>	535
TIGRE	482 <u>A.....A.QS.SGV.L.DEKVE.SN.....A.GV.....G.L.....</u>	541
MORSE	478 <u>A.....AA.QSPDAG.L.EEKAE.AN.W...AG.GV.....GAGRL.....</u>	537
ISO X2 GUÉPARD	478 <u>A.....A.QS.SGV.L.DEKVE.SN.....A.GV.....G.L.....</u>	537
SINGE LION	480 <u>F.S.M.S.DEKLE.SS.A.....TV.....</u>	538
RAT TAUPE	492 <u>K.G.VVY.E.K.E.SN.....E.GV.SR.G.A.....</u>	551
ISO X4 LÉOPARD	478 <u>A.....A.QS.SGV.L.DEKVE.SN.....A.GV.....G.L.....</u>	537
PHOQUE MOINE	481 <u>A.....AA.QS.DAV.L.EEKAE.AS.....AV.GV.....GMGRL.....</u>	540
ISO X2 CHAT	478 <u>A.....A.QS.GGV.L.DEKVE.SS.....A.GV.....G.L.....</u>	537
CHIEN	482 <u>A.....A.QS.SNV.LFKEE.Q.AN.W...E.SVE.G.S.L.....</u>	540
OTARIE	479 <u>A.....AA.QS.DAG.LFEKAE.AN.W...AG.GV.....GAGRL.....</u>	538
RENARD VOLANT	496 <u>DQ.....T.S.VEL.NEK.E.VS.W...A.G.EG.G.SD.....</u>	556
ANE	481 <u>KT.NMRV----.EEKVEAQV.DK.EV.KGMG.T.....</u>	535
ISO X1 ALPAGA	491 <u>N.GS.LVL.NKK.ESRKQ.P.VN.DLT.NVGTSR.....</u>	550
MARSOULIN	488 <u>N.....KV.S.V.L.SKK.E.TSQ.SV.V.RL.EGVG.S.....</u>	547
CASTOR	478 <u>K.KDRY--.E.K.E.SS.....V.G.TGEG.A.....</u>	535
ISO X2 MARSOULIN	488 <u>N.....KV.S.V.L.SKK.E.TSQ.SV.V.RL.EGVG.S.....</u>	547
CERF REEVES	486 <u>KM.GR.S.NEK.E.SSQ.AV.V.RL.EG.G.S.....</u>	544
SURICATE	542 <u>A.....A.QS.NGV.L.EEK.E.SN.....A.DV.....G.L.....</u>	601
CERF ABOYEUR	486 <u>KM.GR.S.NEK.E.SSQ.AV.V.RL.EG.G.S.....</u>	544
ISO X1 GLOBICÉPH	488 <u>N.....KG.G.MFL.NKK.E.SSQ.SV.V.RL.EGVG.S.....</u>	547
LION DE MER	479 <u>A.....AA.QS.DAG.LFEKAE.AN.W...AG.GV.....GAGRL.....</u>	538
ISO X1 MARSOULIN	493 <u>N.....KV.S.V.L.SKK.E.TSQ.SV.V.RL.EGVG.S.....</u>	552
ISO X1 BELUGA	488 <u>N.....KV.S.M.L.NKK.E.TSR.SV.V.RL.EGVG.S.....</u>	547
X1 MARMOTTE JAU	481 <u>T.TGV.Y.E.K.SN.....A.DL.TGI.A.....</u>	540
CHAMEAU	491 <u>D.GG.LVL.NKK.ESRKQ.P.VN.DLT.SVGTS.....</u>	550
CHEVAL	481 <u>KT.NMRV----.EEKVEAQV.DK.EV.T.MG.T.....</u>	535
RORQUAL	486 <u>N.....KV.S.V.L.NEK.E.SSQ.SVP.V.RL.EGVG.S.....</u>	545
PROPIHÈQUE	471 <u>WA.GEV.SFOEK.E.SS.....A.GS.W.VS.T.....</u>	530
NARVAL	488 <u>N.....KV.S.V.L.NK.E.TSR.SV.V.RL.EGVG.S.....</u>	546
BUFFLE	488 <u>E.KM.GR.S.NEK.E.SSQ.SVP.A.RL.EG.G.S.....</u>	546
TAUPE DORÉE	486 <u>K.KS.MIHFEET.E.SNRE.....A.GV.TG.GTG.....</u>	545
ISO X1 GDDAUPHIN	488 <u>N.....KG.G.MFL.NKK.E.TSQ.SV.V.RL.DGVG.S.....</u>	547
GALAGO	483 <u>D.R.....ED.A.GGA.SFEK.E.SS.....AA.DP.L.G.A.P.....</u>	541
ISO X2 BELUGA	484 <u>N.....KV.S.M.L.NKK.E.TSR.SV.V.RL.EGVG.S.....</u>	543

ROUSSETTE EGYPT 488G.Q.....	T	S.VEL.KEK.E.SS.....A..G.....G.Y..	548
MOUTON 487E...	KM	GR.S.NEK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.G.S..	545
ISO X1 ORQUE 488N.....	KG	G.MFL.NKK.E.TSQ.SV..V..RL.EG.VG.S..	547
ISO X2 GLOBICÉPH488N.....	KG	G.MFL.NKK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.VG.S..	547
ISO X1 DAUPHIN G488N.....	KG	S.MFL.NKK.E.TSQ.SV..V..RL.EG.VG.S..	547
MARMOTTE 481K.....	T	TGV.Y.E.K..E.SN.....A..DL.TGI..A..	540
SPERMOPHILE 481T.....	T	T.V.Y.E.K.E.SN.....A..DL.TGI..A..	540
DAUPHIN CHINE 487N.....	KV	S.V.L.NKK.E.TSQ.SV..V..RL.EG.VR.SE.	546
CHEVAL PRZEW 484KT.....		NMRVMEEKVEAQV.A.QV..DK.EV.T.MG.T..	542
SPERMOPHILE RAYÉ481T.....	T	T.V.Y.E.K.E.SN.....A..DL.TGI..A..	540
ISO X1 ZÉBU 488E...	KM	GR.S.NEK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.G.SE.	546
ISO X2 ALPAGA 491N.....	GS	LVL.NKK.ESRQ.P...VN.DLT.NVGTSR.	550
ISO X2 GDDAUPHIN488N.....	KG	G.MFL.NKK.E.TSQ.SV..V..RL.DGVG.S..	547
ZÉBU 488E...	KM	GR.S.NEK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.G.SE.	546
BISON 488E...	KM	GR.S.NEK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.G.SE.	546
CHEVRE 487E...	KM	GR.S.NEK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.G.S..	545
ISO X2 ORQUE 488N.....	KG	G.MFL.NKK.E.TSQ.SV..V..RL.EG.VG.S..	547
RAT KANGOUROU 475K.....	NNV	YFEEKVE.SS.....V..GI.VGDS.A..	534
ISO X2 DAUPHIN G488N.....	KG	S.MFL.NKK.E.TSQ.SV..V..RL.EG.VG.S..	547
MARMOTTE ALPES 481T.....	T	TGV.Y.E.K..E.SN.....A..DL.TGI..A..	540
YACK SAUVAGE 488E...	KM	GR.S.NEK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.G.SE.	546
HÉRISSE 482QHSSRV.LFDEKAEQ.Q...L.D.HRV.T---		A..	537
ISO X3 MARSOUINP466N.....	KV	S.V.L.SK.K.E.TSQ.SV..V..RL.EG.VG.S..	525
GERBOISE 478KT.....		AGVVR.EEAVE.SN.....A..GV.F...A..	537
RAT TAUPE NU 470D..R.....E...	GQGGV	S.E.K.E.SHRE...AT.GP..STGRA.F	529
ISO X3 BÉLUGA 461N.....	KV	S.M.L.NKK.E.TSR.SV..V..RL.EG.VG.S..	520
ISO X3 LAPIN G 486G.....R.....	M	GGVMYRE.TLGKSS...A..GV..GVG.A..	544
RAT TAUPE NU 470D..R.....E...	GQGGV	S.E.K.E.SHRE...AT.GQ..GTGRA.F	529
ISO X5 LEOPARD 432A.....A...	QS	SGV.L.DEKVE.SN.....A..GV...G.L..	491
RAT À TROMPE 479QMKT.MIHFEER.E.SNRE...A..GV..TG.GTG..		538	
ISO X5 LAPIN G 486G.....R.....	M	GGVMYRE.TLGKSS...A..GV..GVG.A..	544
MUSARAIGNE 488KL.S.M..LEKIEKSS..Q...AR.GP.TS.GTT..		546	
MARMOTTE COMMUNE481K.....	T	TGV.Y.E.K..E.SN.....A..DL.TGI..A..	540
YACK SAUVAGE 461E...	KM	GR.S.NEK.E.SSQ.SV..V..RL.EG.G.SE.	519

Query range 10: 541 to 600

Query	541	HSDSQEELWMFVRKKLMMEQENGLRGSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPIGPGPLGHPG	600
COL17A1 HOMME	541	600
AUTO-AG HOMME	576	635
COL17A1-1 HOMME	541	600
BP180 HOMME	541	600
ISO 2 CHIMPANZÉ	541	600
ISO X1 BONOBO	541M.....	600
GORILLE	541	600
ORANGOUTAN	540	599
GIBBON	541	600
GIBBON CENDRÉ	541	.G.....E.....L.....	600
BONOBO	517M.....	576
HOMME ISO CRA_A	332	391
ISO 3 CHIMPANZÉ	541	600
ISO 1 CHIMPANZÉ	541	600
ISO 1 LAMANTIN	535	DGH...A...KN...T.....Q.....L.....L.....	594
ISO X1 PANDA	541	DGH.....L...DR...A...S.....Q.....L.....L.....	600
ISO X2 PANDA	537	DGH.....L...DR...A...S.....Q.....L.....L.....	596
ORYCTÉROPE	540	D.H...T...I.M.N...LT...K...L.....Q.....L.....V...L.....	599
COLUGO	544	GGH.E...Q...W.R...K...L.....Q.....L.....L.....	603
PUMA	542	DGHG..A..L..KG...A...S.....Q.....L.....L.....	601
PHOQUE	537	DGH...V..L...D...A...S.....Q.....L.....L.....	596
PHOQUE-VEAU	541	DGH...V..L...D...A...S.....Q.....L.....V..LS...	600
LOUTRE DE MER	536	DHH...V..L...D...KA...S.....Q.....L.....L...L.....	595
RENARD	541	DGHR.....L...NR...A.....Q.....L.....V.....	600
ISO X1 GUÉPARD	542	DGHG..A..L..KG...A...S.....Q.....L.....L.....	601
LYNX	542	DGHG..A..L..KG...A.....Q.....L.....L.....	601
ISO X1 LÉOPARD	542	DGHG..A..L..LKG...A...S.....Q.....L.....L.....	601
ISO X1 CHAT	542	DGHG..A..L..KG...A...S.S.....Q.....L.....L.....	601
ELEPHANT MER	539	DGH...V..L...D...A...S.....Q.....L.....L.....	598
PHOQUE GRIS	537	DGH...V..L...D...A...S.....Q.....L.....V..LS...	596
ISO 1 ORANGOUTAN	540	599
GRIZZLI	536	DGH.....L...DR...A...S.....Q.....L.....L.....	595
TIGRE	542	DGHG..A..L..LKG...A...S.....Q.....L.....L.....	601
MORSE	538	DGH...A..L...D...A...S.....Q.....L.....N..L..R...	597
ISO X2 GUÉPARD	538	DGHG..A..L..KG...A...S.....Q.....L.....L.....	597
SINGE LION	539	N.NN...V...N...T.....Q.....L.....L.....	598
RAT TAUPE	552	DGP...AI..L...N...T.....Q.....L.....L.....	611
ISO X4 LÉOPARD	538	DGHG..A..L..LKG...A...S.....Q.....L.....L.....	597
PHOQUE MOINE	541	DGH...V..L...D...A...S.....Q.....L.....L.....	600
ISO X2 CHAT	538	DGHG..A..L..KG...A...S.S.....Q.....L.....L.....	597
CHIEN	541	DGHQ.....L...NR...A.....Q.....L.....V.....	600
OTARIE	539	DGH...V..L...D...A...S.....Q.....L.....L..R...	598
RENARD VOLANT	557	DGHG..V..L...D...R.....L.....Q.....L.....L.....	616
ANE	536	YD.G.K...E...N.....Q.....L.....L.....	596
		↓	
ISO X1 ALPAGA	551	GDY.....Q...G.....Q.....L.....	610
MARSOUIN	548	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....Q.....	607
CASTOR	536	DGPG..A..L...N.....N.....Q.....L.....V..L.....	595
ISO X2 MARSOUINP	548	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....Q.....	607
CERF REEVES	545	DGYN..DI.Q...AR..T.....VQ.....Q.....	604
SURICATE	602	DGF...A..L..KG...A...S.....Q.....L.....L.....	661
CERF ABOYEUR	545	DGYN..DI.Q...AR..T.....VQ.....Q.....	604
ISO X1 GLOBICÉPH	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....Q.....	607
LION DE MER	539	DGH...V..L...D...A...S.....Q.....L.....L..R...	598
ISO X1 MARSOUINP	553	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....Q.....	612
ISO X1 BELUGA	548	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....Q.....	607
X1 MARMOTTE JAU	541	DIP...A..L...N...I.....Q.....L.....L.....	600
CHAMEAU	551	GDY.....Q...G.....Q.....L.....	610
CHEVAL	536	YD.G.K...E...N.....Q.....L.....L.....	596
		↓	
RORQUAL	546	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.A.....Q.....	605
PROPITHÈQUE	531	DGQD..A..L...D...T...Q.....Q.....L..I.....	590
NARVAL	547	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....Q.....	606
BUFFLE	547	DDYNL.DV.Q.MKVR..A.....VQ.....Q.....	606
TAUPE DORÉE	546	D.H...A..I...N...T.....Q.....L.....L.....	605
ISO X1 GDDAUPHIN	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....Q.....	607

GALAGO	542	DAY...A..L...N...A.....Q.....L..I.....	601
ISO X2 BELUGA	544	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....	603
ROUSSETTE EGYPT	549	DGH...V..L...D...T.....Q.....E..L.....I.....	608
MOUTON	546	DGYNL..DI..Q..SVR..KT.....IQ.....Q.....	605
ISO X1 ORQUE	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....	607
ISO X2 GLOBICÉPH	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....	598
ISO X1 DAUPHIN G	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....	607
MARMOTTE	541	DIP...A..L...N...I.....Q.....L.....L.....	600
SPERMOPHILE	541	DIP...A..L...N...I.....Q.....L.....L.....	600
DAUPHIN CHINE	547	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....	606
CHEVAL PRZEW	543	YD.G.K...E...N.....Q.....L.....	603



SPERMOPHILE RAYÉ	541	DIP...A..L...N...I.....Q.....L.....L.....	600
ISO X1 ZÉBU	547	DDYNL..DV..Q..MKVR..T.....VQ.....Q.....	606
ISO X2 ALPAGA	551	GDY.....Q...G.....Q.....L.....	610
ISO X2 GDDAUPHIN	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....	598
ZÉBU	547	DDYNL..DV..Q..MKVR..T.....VQ.....Q.....	606
BISON	547	DDYNL..DV..Q..MKVR..T.....VQ.....Q.....	606
CHEVRE	546	DGYNL..DI..Q..SVR..KT.....VQ.....Q.....	605
ISO X2 ORQUE	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....	598
RAT KANGOUROU	535	DGL...A..L...N...T.....Q.....P..VI..N.....	594
ISO X2 DAUPHIN G	548	DGY...D..Q..M.G...A.....N.....Q.....	598
MARMOTTE ALPES	541	DIP...A..L...N...I.....Q.....L.....L.....	600
YACK SAUVAGE	547	DDYNL..DV..Q..MKVR..T.....VQ.....Q.....	606
HÉRISSON	538	DG.G..A..L...N...T..K...L.....Q.....L.....A..L.....	597
ISO X3 MARSOUINP	526	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....	585
GERBOISE	538	DGP...AI..L...N...T.....TQ.....	597
RAT TAUPE NU	530	EGG.....V..KN...Q.....L.....S.....	590



ISO X3 BÉLUGA	521	DGY...D..Q..M.G...A.....Q.....	580
ISO X3 LAPIN G	545	DGH...A..L...ER...T.....N.....Q.....L.....LR.....	604
RAT TAUPE NU	530	EGG.....V..KN...Q.....L.....S.....	590



ISO X5 LEOPARD	492	DGHG...A..L..LKG...A...S.....Q.....L.....L.....	551
RAT À TROMPE	539	D.HG...A..V...N...T.....N.....Q.....L..I.....	598
ISO X5 LAPIN G	545	DGH...A..L...ER...T.....N.....Q.....L.....LR.....	604
MUSARAIGNE	547	DGSN...A..L...N...T.....N.....L.....	606
MARMOTTE COMMUNE	541	DIP...A..L...N...I.....Q.....L.....L.....	600
YACK SAUVAGE	520	DDYNL..DV..Q..MKVR..T.....HIT.H...LL.FSFSV.T.....Q.....	586



E SKASSS

Annexe 3 : Conservation de certains sites de clivage entre 7 espèces mammifères proches :

Les sites de clivage de toute la BP180 sont indiqués en couleur :

- Cleaved by Aspartic protease after this residue (P1 position)
- Cleaved by Cysteine protease after this residue (P1 position)
- Cleaved by Metalloprotease after this residue (P1 position)
- Cleaved by Serine protease after this residue (P1 position)
- .
- Cleaved by different multiple protease superfamilies after this position (P1 position)

Sur chaque ligne sont comparés les espèces suivantes :

- Homme
- Singe rhésus
- Lapin (isoforme X1)
- Mouton
- Chien
- Souris
- Rat

1
M D V T K K N K R D G T E V T **E** R I V T E T V T T R L **T** S L P P K G G T
M D V **T** **M** K N - R D G T E V T **E** R I V T E T V T T R L **T** S L P P K G G T
M D V T K K N K R E G T E V T **E** R L I T E T V T T R L **T** S L P P K G G T
M D V T - K N K R D G T E V T **E** R I I T E T V T T R L **T** S L P P K G G T
M D V T K K N K R D G S E V T **E** R I I T E T V S T R L **T** S L P P K G G T
M D V T K K S K R D G T E V T **E** R I V T E T V T T R L **T** S L P P K G S T
M D V T K K S M R D G T E V T **E** R I V T E T V T T R L **T** S L P P K G S T

37
S N G Y A K T A S L G G G S R L E K Q S L **T** H G S **S** G **Y** I N S T G S T R
S N G Y A K I G S F **G** G G S R L E K Q S L **T** H G S **S** G **Y** I N S T G S T R
G N G Y A K T G S L G G G S R M E K Q S L **I** H G S **S** S **Y** **I** N S S G S L **R**
S N G Y A K T G S L G G G S R L E K Q S L **T** H G S **S** G **Y** I N S S G S M R
S N G Y A K T G S L S G G S R L E K H S L **T** H G S **S** G **Y** I N S S G S T R
S N G Y A K T G S L G G G S R L E K Q S L **T** H G S **S** G **Y** I N S S G S I R
S N G Y T K T **G** S L G G G S R L E K Q S L **T** H G S **S** G **Y** I N S S G S L R

73
G H A S **T** S S Y R R A H S P **A** S **T** L P **N** S P G S T F **E** R K T H **V** T R H A
G H P S T S S Y R R A H S P **A** S **T** L P **N** S P G S T F **E** R K T H **V** T R H A
G S T S T S S Y R R A H S P **S** S T L P **N** S P G S T F **E** R K S H G **T** R H G
G N A S T S S Y R R A H S P **A** S **T** L P **N** S P G S T F **E** R K T H **V** T R H G
G N A S T S S Y R R A H S P **A** S **T** L P **N** S P G S T F **E** R K I H I T R H G
G N A S T S S Y R R T H S P **A** S **T** L P **N** S P G S T F **E** R K A **H** M **T** R H G
G N A S T S S Y R R A H S P **A** S **T** L P **N** S P G S T F **E** R K T H M S R H G

109

- Y E G S S S G N S S P E Y P R K E F A S S S T R G R S Q T R E S E I R
 - Y E G S S S G N S S P E Y P R K E F A S S S T R G R S Q T R E S E I R
 A Y E G S S S G N S S P E Y P R K E F A S S S T R G R S Q T R E S E I R
 T Y E G S S S G N S S P E Y P R K E F A S S S T R G R S Q T R E S E I R
 T Y E G S S S G N S S P E Y P R K E F A S S S T R G R S Q T R E S E I R
 T Y E G S S S G N S S P E Y P R K E L A S S S T R G R S Q T R E S E I R
 T Y E G S S S G N S S P E Y P R K E L A S S S T R G R S Q T R E S E I R

144

V R L Q S A S P S T R W T E L D D V K R L L K G S R S A S V S P T R N S
 V R L Q S A S P S T R W T E L D D V K R L L K G S R S A S V S P T R N S
 V R L Q S A S P S T R W T E L D D V K R L L K G S R S A S A S P T R N S
 V R L Q S A S P S T R W T E L D D V K R L L K G S R S A S V S P T R N S
 V R L Q S A S P S T R W T E L D D V K R L L K G S R S A S V S P T R N S
 V R L Q S A S P S T R W T E L D E V K R L L K G S R S A S A S P T R N T
 V R L Q S A S P S T R W T E L D E V K R L L K G S R S A S A S P T R N T

180

S N T L P I P K K G T V E T K I V T A S S Q S V S G T Y D A T I L D A N
 S N T L P I P K K G T V E T K I V T A S S Q S V S G T Y D A T I L D A N
 S N T L P I P K K G T V E T K M V T A S S Q S V S G A Y D T T I L D A N
 S N T L P I P K K G T V E T K V V T A S S Q S V S G T Y D T T I L D A N
 S N T L P I P K K G T V E T K M V T A S S Q S V S G T Y D A T I L D A N
 S N T L P I P K K G T V E T K T V T A S S H S V S G T Y D S A I L D T N
 S N T L P I P K K G T V E T K T V T A S S H S V S G T Y D S T I L D S N

216

L P S H V W S S T L P A G S S M G T Y H N N M T T Q S S S L L N T N A Y
 L P S H V W S S T L P A G S S M G T Y H N N M T T Q S S S L L N T N A Y
 L P S H M W S S T L P A G S S M G T Y H N N M T T Q S S S L L N T N A Y
 L P S H V W S S T L P A G S S M G T Y H N N I T T Q S S S L L N T N A Y
 L P S H M W S S T L P A G S S M G T Y H N N V T T Q S S S L L N T N A Y F P
 P H M W S S T L P A G S S L G T Y Q N N I T A Q S T S L L N T N A Y
 F P P H M W S S T L P A G S S M G T Y H N N I A T Q S T S L V N T N A Y

252

S A G S V F G V P N N M A S C S P T L H P G L S T S S S V F G M Q N N L
 S A G S V F G V P N N M A S C S S T L H P G L S T S S S V F G M Q N N L
 S A G S V F G V P N N M A S C S S T L H P G L S T C S S V F G M Q N N L
 S A G S V F G V P N N M A S C S P T L Q P G I S T S S S V F G M Q N N L
 S A G S V F G V P N N M T S G S S T L H P G V S T C S S V F G M Q N N L
 S T G S V F G V P N N M A S C S P T L H P G L S C S S V F G M Q N N L
 S A G S V F G V P N N M A S C S P T L H P G L S C S S V F G M Q N N L

288

A P S L T T L S H G T T T T S T A Y G V K K N M P Q S P A A V N T G V S
 A P S S T T L S H G T T T T S T A Y G V K K N M P Q S P V A V N T G V S
 A P S S S T L S H G T A T T S T A Y A V K K N L P Q S P A V A S T A V S
 A P S S S T L S H G M A A T S T A Y G V K K N M P Q S P T A V S T G V S
 A P S S S T L S H S T A T A S T A Y G M K K N L P Q S P A V V S T G V S
 A P S S S V L S H G T T T A S T A Y G A K K N V P Q P P T V T S T G V S
 A P C S S V L S H G T T T A S T A Y G V K K N V P Q P P T V T S T G V S

324

T S A A C T T S V Q S D D L L H K D C K F L I L E K D N T P A K K E M E
T S A A C T T S V Q S D D L L H K D C K F L I L E K D N T P T K K E M E
T S A A C T T R V Q S D E Q L H K D C K F L I L E K D N V P A K K E M E
T S A A S T T N V Q N D D L L H K D C K F L I L E K D N T P A K K E M E
T S A A C T T N V Q N E D L L H K D C K F L I L E K D N T P A K K E M E
T S A T C T T S V Q S D D L L H K D C K F L I L E K D N T P A K K E M E
T S A A C T T S V Q S D D L L H K D C K F L I L E K D N V P A K K E M E

360

L L I M T K D S G K V F T A S P A S I A A T S F S E D T L K K E K Q A A
L L I M T K D S G K V F T A S P A S I A A T S F S E D T L K K E K Q A A
L L I M T K D S G K V F T A S P A S V A A T S F S D D T L K K E K Q A A
L L I M T K D S G K V F T A S P A S V T A T S F S E D T L K K E K Q A A
L L I M T K D S G K V F T A S P A S I A A T S F S D D T L K K E K Q A A
L L I M T K D S G K V F T A S P A T I S S T S F S E D T L K K E K Q A A
L L I M S K D S G K V F T A S P A S I S S T S F S E D T L K K E K Q A A

396

Y N A D S G L K A E A N G D L K T V S T K G K T T T A D I H S Y G S S G
Y N A D S G L K A E A N G D L K T V S T K G K T T T A G I H S Y S S G G
Y A A D A S L K A E A N G D L K S M S A K G K A G S A E I H G Y D H G G
Y T - D T Y L V S E A N G D V K T V S A K G K G S S A D V H G Y D H R H
Y T A D T C L V S D A N G D V K T V S T K G K A A S A E M H N Y N H R G
Y A A D T C L K A D V N G D L N T V S T K S K M T S A E N H G Y D R G G
Y A A D T C L K A D V N G D L N T V S T K S K A I S A E N H S Y D R G V

432

G G G S G G G G G V G G A G G - - - - - G P W G P A P A W C
- V G G T G G G G N V G G A G - - - - - S G P W G A A P A W C
G G G G - G R G G - G G G G G - - - - - G G G G G G G P W G A A P A W C
G G G G G G S G G A L G S G - - - - - A A G G G G K G S W G A A P A W C
G G S G G G G G G G G G G G - - - - - G P W G A A P A W C
G G G R - G K G G G A - - G G G G G G G G A S G G G G A W G A A P A W C
G G G R - G K S G V A - - G G G G G G G G G G S G G G T W G A A P A W C

457

P C G S C C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L A E E V
P C G S C C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L A E E V
P C G S C C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L G E E V
P C G S W C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L A E E V
P C G S C C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L A E E V
P C G S C C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L A E E V
P C G S C C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L A E E V

493

R K L K A R V D E L E R I R R S I L P Y G D S M D R I E - K D R L Q G M
R K L K A R V D E L E R F R S S M L S D - E K L E R S S - K A R L Q G M
R K L R A R V D E L E R M R G G V M Y R E D T L G K S S - K D R L Q A -
R K L K A R V E E L E K M R G R - L S Y N E K M E R S S - Q D S V Q G V
R A L K A R V A E L E Q S R S N V L L F K E E M Q R A N - K D W L Q G E
R K L K A R V E E L E K T K - - V L Y H D V Q M D K S N - R D R L Q A E
R K L K A R V E E L E K T K - - V L Y H D I V K T D R S S R D R L Q G E

529

A P A A G A D L D K I G L H S D S Q E E L W M F V R K K L M M E Q E N G
 A P T V G A D L D K I G L N S N D Q E V L W M F V R N K L M T E Q E N G
 A P G V G A G V G K A G L D G H S Q E A L W L F V R E R L M T E Q E N G
 A P R L G E G L G K S G L D G Y N L E D I W Q F V S V R L K T E Q E N G
 A P S V E A - G G K L G L D G H Q Q E E L W L F V R N R L M A E Q E N G
 A P S L G P G L G K A E L D G Y S Q E A I W L F V R N K L M T E Q E N G
 A P S L G P G L S K A E M D D Y G Q E A I W L F V R N K L M T E Q E N G

565

N L R G S P G P K G D M G S P G P K G D R G F P G T P G I P G P L G H P
 N L R G S P G P K G D M G S P G P K G D R G F P G T P G I P G P L G H P
 N L R G N P G P K G D M G S Q G P K G D R G L P G T P G I P G P L G L R
 N L R G S P G P K G D M G I Q G P K G D R G F P G T P G I P G P L G H Q
 N L R G S P G P K G D M G S Q G P K G D R G L P G T P G I P G V L G H P
 N L R G S P G P K G D M G S Q G P K G D R G L P G T P G I P G P L G H P
 N L R G S P G P K G D T G S Q G P K - D R G L P G I P G T P G P L G H P

601

G P Q G P K G Q K G S V G D P G M E G P M G Q R G R E G P M G P R G E A
 G P E G P K G Q K G S V G D P G M E G P M G Q R G R E G P M G P R G E P
 G P E G P K G Q K G S V G D P G M E G P M G Q R G R E G P M G P R G E P
 G P E G P K G Q K G N M G E P G M E G P M G Q R G R E G P M G P R G E P
 G P Q G P K G Q K G S V G E P G M E G P M G Q R G R E G P M G P R G E P
 G P E G P K G Q K G S I G D P G M E G P I G Q R G L A G P M G P R G E P
 G P E G P K G Q K G S I G D P G M E G P I G Q R G L A G P M G P P G E P

637

G P P G S G E K G E R G A A G E P G P H G P P G V P G S V G P K G S S G
 G P P G S G E K G E R G A A G E P G P H G P P G V P G S V G P K G S S G
 G P P G F G E K G E R G A A G E P G P H G P P G V P G S V G P K G S N G
 G P P G F G E K G D R G D A G K P G I P G P P G V P G S V G P K G S S G
 G P P G F G E K G D R G A A G E P G V Q G P P G V P G S V G P K G S G G
 G P P G S G E K G D R G I A G E Q G P Q G L P G V P G P P G L R G H S G
 G P P G S G E K G D R G I A G E Q G P R G L P G V P G S P G L R G T S G

673

S P G P Q G P P G P V G L Q G L R G E V G L P G V K G D K G P M G P P G
 S P G P Q G P P G P V G L Q G L R G E V G L P G V K G D K G P M G P P G
 S P G P Q G P P G A I G L Q G L R G E V G L P G V K G D R G S M G P P G
 S P G P Q G P P G S I G P Q G L R G E V G L P G I K G D K G P M G P P G
 S P G P Q G P P G P M G P Q G L R G E V G L P G I K G D K G P M G P P G
 S P G P Q G P P G A V G P Q G L R G D V G L P G V K G D K G L M G P P G
 S P G P Q G P P G S V G P Q G L R G E V G L P G V K G D K G L V G P P G

709

P K G D Q G E K G P R G L T G E P G M R G L P G A V G E P G A K G A M G
 P K G D Q G E K G P R G L T G E P G M R G L P G A V G E P G A K G A M G
 P K G D Q G E K G P R G L T G E P G V R G L P G A V G E P R A K G A M S
 P K G D Q G E K G P R G L T G E P G L K G L P G A V G E P G A K G A M G
 P K G D Q G E K G P R G L T G E P G L R G L P G A V G E P G A K G A V G
 P K G D Q G E K G P R G L T G E P G I R G L P G A V G E P G A K G A M G
 P K G D Q G E K G P R G L T G E P G I R G L P G A V G E P G A K G A M G

1146

G L P G P P G P P G L P G T S Y E E L L S L L R G S E F R G I V G P P G
 G L P G P P G P P G L P G T S Y E E L L S L L R G S E F R G I V G P P G
 G L P G P P G P P G L P G T S Y E E L L S L L R G S E F R G I V G P P G
 G L P G P P G P P G L P G T S Y E E L L S L L Q G S E F R G I V G P P G
 G L P G P P G P P G L P G T S Y E E L L S L L Q G S E Y R G I I G P P G
 G H P G P P G P P G L P G T S Y E E L L T M L R G S D Y R N I I G P P G
 G H P G P P G P P G L P G T S Y E E L L T M L R A A G L S S I A G P P G

1182

P P G P P G I P G N V W S S I S V E D L S S Y L H T A G L S F I P G P P
 P P G P P G I P G N V W S S I S V E D L S S Y L H T A G L S F I P G P P
 P P G P P G L P G N V W S S I S M E D L S S Y L H T A G F S S I P G P P
 P P G P P G L P G S S W S S I S M E D L S S Y L Q T A G L S S I P G P P
 P P G P P G I P G N A W S S I S V E D L S Y L H T A G V S S I P G P P
 P P G P P G M P G N A W S S I S V E D L S S Y L H T A G L S S I P G P P
 P P G P P G - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

1218

G P P G P P G P R G P P G V S G A L A T Y A A E N S D S F R S E L I S Y
 G P P G P P G P R G P P G V S G A L A T Y A A E N S D S F R S E L I S Y
 G P P G P P G P R G P P G V S A A L A T Y A A E N S D N F R S E L I S Y
 G P P G P P G P R G P P G I S G A L A T Y A A E N S D S F R S E L I S Y
 G P P G P P G P R G P P G V S G A L A T Y A A E N S D S F R S E L I S Y
 G P P G P P G P R G P P G V S A A L S T Y A A E N S D N F R S E L I S Y
 - - - - - P R G P P G V S A A L A T Y A A E N S D N F R S E L I S Y

1254

L T S P D V R S F I V G P P G P P G P Q G P P G D S R L L S T D A S H S
 L T S P D V R S F I V G P P G P P G P Q G P P G D S R L L S T D A F H S
 L T S P D V R S F I V G P P G P P G P Q G P P G D S R L L P L D A A Y S
 L T S P D V R S I V G P P G P P G P Q G P P G - - - - - D S S Y S
 L T S P D V R S I V G P P G P P G P G P P G D S R L V S M D G S Y S
 L T S P D V R S F I V G P P G P P G P Q G P P G D - - - G H L R E N Y N
 L T S P D V R S F I V G P P G P P G P Q G P P G D - - - - - Y N

1290

R G S S S S S H S S S V R R G S S Y S S S M S T G G G A G S L C A G G
 R G S S S S S H S S S V R R G S S Y S S S T G T C A G - T G S L G T G G
 R S S S S S - - - - - A R R S S S Y S S T - - - - - G G S L G E G G
 R S G S S S - - - - - S F S R D T S Y S S S M G I G G A S G G S L G E G G
 R D S R S S S H S A S V S R G S S Y S S S M G I G G A S G G S L G E A G
 W S S S S S - - - - - A R R G T S Y S S S T G I G G T N G S L G E G G
 W G S G S S - - - - - A R R G T S Y S S S M G T G R T N G S L G E G G

1326

A F G E A A G D R G P Y G T D I G P G G G Y G A A A E G G M Y A G N G G
 A F G A A T G D G G P Y G T D T G P G R S Y G A A A E G G M Y G G N G G
 A F G A - - G A G G P Y G T D I G P G G G L E A A E - G G A Y G S N G G
 A F G - - - - - - - - - - M D M G R G Y G A V P E G G M Y G G - D G
 A F G - - - - - - - - - - L D M G L G R G Y G G A A E G G M Y G G E G G
 A Y G - - A G D G G P Y G T D I G P G G G Y G A A A G G G I Y G T N G D
 A F G - - A G D G G P Y G T D V G P G G G Y G A A A G G G V Y G T N G E

1362

L L G A D F A G D L D Y N E L A V R V S E S M Q R Q G L L Q G M A Y T V
 L F G A D F A G G L D Y N E L A V R V S E S M Q R Q G L L Q G M A Y T V
 S S R N G F A G D L D Y N E L A V R V S E S L Q R Q G L L Q G M A Y T V
 R F G A G F A G G L D Y N E L A V R V S E S L Q R Q G L L Q G M A Y T V
 P L G A G F A G G L D Y N E L A V R V S E S L Q R Q G L L Q G M A Y T V
 S F R D G F T G D L D Y N K L A V R V S E S M Q R Q G L L Q G M A Y T V
 S F R G S F T G D L D Y N T L A L R V S E S M Q R Q G L L Q G M A Y T V

1398

Q G P P G Q P G P Q G P P G I S K V F S A Y S N V T A D L M D F F Q T V
 Q G P P G Q P G P Q G P P G I S K V F S A Y S N V T A D L M D F F R T Y
 Q G P P G Q P G P Q G P P G I S K V F S A Y S N V T E D L M D F F R T Y
 Q G P P G R P G P Q G P P G I S K I F S A Y S N V T E D L M D F F R T Y
 G P P G Q P G P G P P G I S K V F S A Y S N V T E D L M D F F T Y Q G
 P P G - - - P Q G P P G I S R V F S A Y S N V T Q D L M D F F Q T V
 Q G P P G - - - P Q G P P G I S K V F S A Y S N V T Q D L M D F F R T Y

1434

G A I Q G P P G Q K G E M G T P G P K G D R G P A G P P G H P G P P G P
 G A I Q G P P G Q K G E M G T P G P K G D R G P A G P P G H R G P P G P
 G T I P G P P G Q K G E V G I P G P K G D R G S A G P R G L P G P P G P
 G A I P G P P G Q K G E M G I P G P K G E R G P A G P P G R S G P P G P
 G A I P G P P G Q K G E V G I P G P K G E R G P A G P S G R P G P P G P
 G T I P G P P G Q K G D V G T P G P K G D R G P A G P R G P P G P P G P
 G A I P G P P G Q K G D M G T P G P K G D R G P A G P R G P P G P P G P

1470

R G H K G E K G D K G D Q V Y A G R R R R R S I A V K P
 R G H K G E K G D K G D Q I Y A G R R R R R S I A V K P
 R G H K G E K G D K G D Q V Y I G R R - K R S I A T K P
 R G H K G E K G D K G D Q V Y T G R R - R R S I A V K P
 R G H K G E K G D K G D Q V Y A - R R R K R S I A I K P
 R G N K G E K G D K G D Q V Y T G R R - K R S I A I K P
 R G N K G E K G D K G D Q V Y T G R R - K R S I A I K P

1497

Annexe 4 : Représentation graphique montrant la répartition des points après ajout d'EDTA par rapport à la valeur théoriquement attendue

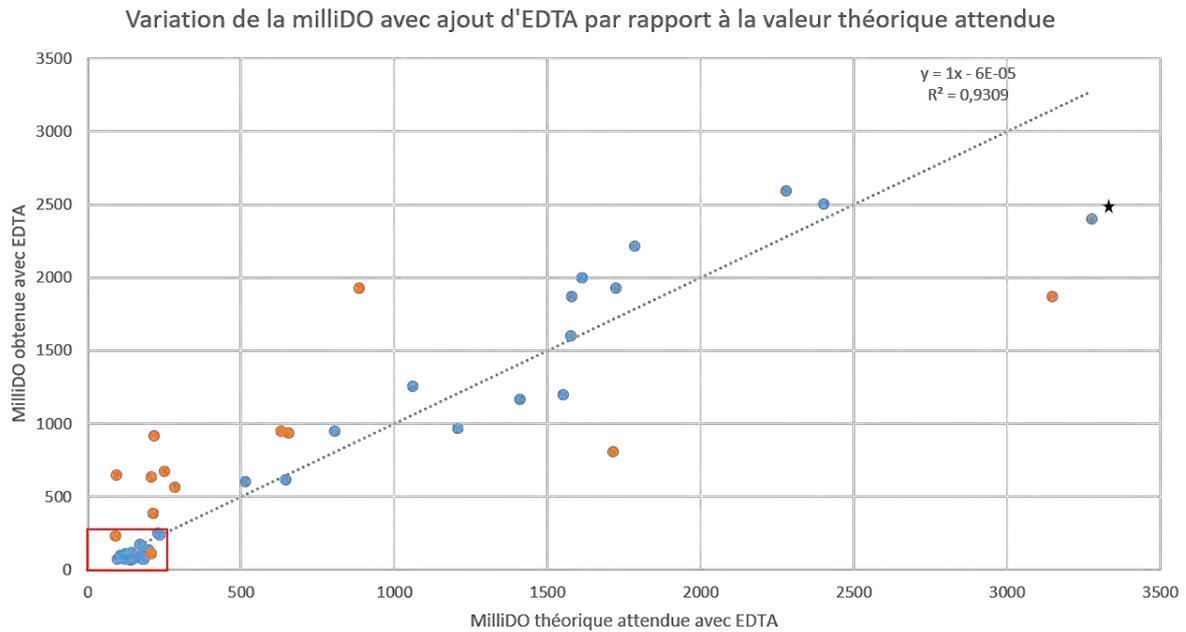


Figure 46 : Les points concernés par une différence importante en fonction de la présence ou non d'EDTA sont les mêmes dans la représentation des points en fonction de la valeur théorique attendue. Le cadre rouge indique le seuil à partir duquel les valeurs sont considérées positives (250 milliDO). Les points bleus sont les points ayant servi à construire la droite de régression, ce sont ceux dont l'écart à la moyenne n'excède pas 15% entre la valeur obtenue et la valeur théorique. Les points orange représentent les points pour lesquels l'écart à la moyenne est supérieur à 15% et donc pour lesquels la variabilité peut être expliquée par l'ajout d'EDTA. Le point indiqué par une astérisque est le plus écarté de la droite de régression mais a quand même été intégré dans le calcul de cette dernière car sa non-intégration au calcul de la droite ne change pas significativement les conclusions.

Annexe 5 : Valeurs (milliDO) obtenues après ELISA IgE anti-NC16A avec/sans EDTA

	Sans EDTA	Avec EDTA	Théorique avec EDTA	Ecart à la moyenne entre valeur obtenue et valeur théorique en présence d'EDTA
Calibration 1/2	1203	1998	1615	11%
Calibration 1/8	599	947	805	8%
Calibration 1/16	383	601	515	8%
Calibration 1/64	173	242	234	2%
Calibration 1/128	126	175	171	1%
Patient PB 1	153	639	207	51%
Patient PB 2	1050	1167	1409	-9%
Patient PB 3	900	969	1208	-11%
Patient PB 4	1156	1197	1552	-13%
Patient PB 5	65	235	89	45%
Patient PB 6	185	672	250	46%
Patient PB 7	210	567	283	33%
Patient PB 8	158	385	213	29%
Patient PB 9	91	113	124	-4%
Patient PB 10	77	100	105	-2%
Patient PB 11	1791	2506	2403	2%
Patient PB 12	152	110	205	-30%
Patient PB 13	790	1258	1061	9%
Patient PB 14	1699	2592	2280	6%
Patient PB 15	2443	2403	3277	-15%
Patient PB 16	168	254	227	6%
Patient PB 17	1285	1927	1725	6%
Patient PB 18	660	1931	887	37%
Patient PB 19	487	934	655	18%
Patient PB 20	470	948	632	20%
Patient PB 21	1277	812	1714	-36%
Patient PB 22	69	647	94	75%
Patient PB 23	1176	1871	1578	8%
Patient PB 24	161	920	217	62%
Patient PB 25	481	620	647	-2%
Patient PB 26	1174	1602	1576	1%
Patient PB 27	1329	2216	1784	11%
Patient PB 28	1203	1998	1615	11%
Patient PB 29	2347	1870	3148	-25%

Contrôle 1	92	73	125	
Contrôle 2	97	74	132	
Contrôle 3	113	79	153	
Contrôle 4	133	112	180	
Contrôle 5	102	65	138	
Contrôle 6	106	74	144	
Contrôle 7	133	74	180	
Contrôle 8	135	75	183	
Contrôle 9	137	135	185	
Contrôle 10	104	118	141	
Contrôle 11	76	78	104	
Contrôle 12	103	114	140	
Contrôle 13	70	74	95	
Contrôle 14	146	140	197	
Contrôle 15	86	80	117	

Annexe 6 : Données cliniques et biologiques des patients atteints de PB étudiées en ELISA IgE anti-NC16A

Patient	Age (ans)	Sexe	IgE anti-NC16A (UA)	IgG anti-NC16A	IgE totales	PNE %	PNE (G/L)	Présence de bulles	Phénotype pauci- ou multi-bulleux	Erythème	Prurit	Phénotype urticarien	Présence d'eczéma ou de prurigo	Atteinte muqueuse	Localisé ou étendu	Sévérité	PNE sur biopsie	Intensification thérapeutique (MTX, Rituximab, Omalizumab, IgIV)
1	83	M	1448	200	756	0,5	7,3	1	M	1	1	1	0	0	0	1	0	1
2	97	F	22	146	205	0	0	1	P	1	1	0	0	0	E	0	0	0
3	92	F	37	144	1661	35,4	6,3	1	M	1	1	0	0	0	E	0	1	0
4	92	M	33	200	2079	44,8	5,8	1	P	0	1	1	0	0	E	1	1	0
5	96	F	306	176	664	7,1	0,5	1	M	1	1	0	0	0	E	0	1	0
6	75	F	32	113	NF	16,4	2,1	1	M	1	1	1	0	0	E	0	1	0
7	93	M	1814	136	NF	0,4	0,1	1	P	1	1	0	0	0	NSP	0	1	0
8	71	F	454	107	128	1,9	0,2	1	P	1	1	1	0	0	NSP	0	1	1
9	94	M	24	18	NF	2,9	0,2	1	P	1	1	0	0	0	NSP	0	1	0
10	92	M	17	137	1757	NF	NF	1	P	1	0	1	0	0	L	0	1	0
11	92	M	274	200	NF	5,3	0,6	1	M	1	1	0	0	0	E	0	1	0
12	85	M	34	166	NF	17,1	1,5	1	M	1	1	1	0	0	NSP	NSP	1	1
13	70	M	6	37	NF	7	0,5	1	P	1	1	0	1	0	E	0	0	1
14	82	M	188	98	NF	5,70	0,50	1	M	1	1	0	0	0	NSP	0	1	0
15	68	M	175	112	NF	10,3	1	1	NSP	1	1	0	0	0	NSP	0	NA	1
16	90	M	3211	33	NF	10,9	0,9	1	M	1	1	1	0	0	E	1	1	1
17	74	M	417	132	450	20,8	1,7	1	P	1	1	0	1	0	NSP	0	1	0
18	83	M	789	178	947	10,9	1,9	1	M	1	1	0	0	0	E	1	1	1
19	76	M	42	11	1838	4,7	0,2	1	P	1	1	0	0	0	E	0	1	0
20	91	F	7	56	949	3,7	0,3	1	P	1	1	0	0	0	E	0	1	0

21	78	F	410	63	425	0,7	0,1	1	NSP	1	1	1	0	0	L	0	1	0
22	86	M	211	200	NF	34,5	4,5	1	NSP	1	1	1	0	0	E	1	1	0
23	86	M	850	87	NF	NF	NF	1	M	1	1	1	0	0	E	NSP	NA	1
24	96	M	78	29	NF	11,7	1,1	1	NSP	1	1	1	1	0	L	0	1	0
25	77	M	693	92	689	0,8	0,1	1	NSP	1	1	1	0	0	NSP	0	1	0
26	73	F	793	200	NF	8,4	1,8	1	M	1	1	0	1	0	E	0	1	0
27	75	M	27	2	NF	13,9	0,5	0	0A	1	1	0	0	0	NSP	0	1	0
28	66	M	1745	32	NF	NF	NF	0	0A	1	1	0	1	0	E	0	1	0
29	69	M	141	170	NF	11,1	0,7	1	NSP	1	1	0	1	0	E	1	NA	1
30	87	F	18	200	NF	0,50	0,00	1	P	1	0	0	0	0	E	0	0	0
31	94	M	981	200	NF	10,20	1,00	1	P	1	1	0	1	0	NSP	NSP	1	1
32	90	F	1571	161	NF	16,4	1,1	1	M	1	1	1	0	0	E	1	1	0
33	94	M	1057	148	6722	40,8	4,4	1	M	1	1	0	0	0	E	0	1	0
34	73	F	1818	198	4645	1,8	0,2	1	M	1	0	0	0	1	L	1	NA	1
35	84	F	78	200	NA	26,3	4,4	1	NSP	1	0	1	0	0	E	0	1	0
36	99	F	1547	180	NF	2,7	0,3	1	M	1	1	0	1	0	E	1	1	0
37	89	M	7	17	52,00	3,70	0,30	1	P	1	0	1	0	0	L	0	1	0
38	78	F	331	189	2908	17,2	1,7	1	P	1	0	0	1	0	L	0	1	0
39	94	F	225	161	NF	10	0,7	1	P	1	1	0	1	0	E	0	1	0
40	89	F	74	170	NA	NA	NA	NSP	NSP	NSP	NSP	NSP	NSP	NSP	NSP	NSP	NA	NSP
41	83	M	127	160	NF	NF	NF	0	M	1	1	1	1	0	E	0	1	0
42	94	F	143	157	614	6,6	1	1	P	1	1	0	0	0	L	0	1	0
43	67	M	829	200	NF	20,10	3,10	1	P puis M	1	1	0	0	0	E	0	1	0
44	74	F	7	18	NA	2,7	0,2	1	P	1	0	0	1	0	L	0	NA	0
45	72	M	459	200	NF	21,4	2,6	1	M	1	1	1	0	0	E	1	1	1
46	71	F	42	176	51	2,5	0,2	1	P	1	1	0	0	0	NSP	0	1	1
47	88	M	135	166	1153	3,8	0,3	1	M	1	0	0	0	1	L	0	1	1
48	83	M	140	181	NA	29	2	1	M	1	1	0	0	0	L puis E	0	1	0

49	87	M	26	170	NA	3,2	0,6	1	P	1	0	0	0	0	L	0	1	0
50	86	M	43	200	32	6	0,7	1	M	1	1	0	1	0	E	0	0	1
51	88	M	174	75	NA	2	0,2	1	P	1	1	0	0	1	E	1	1	1
52	90	M	113	173	NA	26,3	4,1	1	P	1	1	0	0	0	L	0	1	0
53	87	M	234	117	3032	23,5	1,5	0	NA	1	1	0	1	0	E	0	1	1
54	79	M	158	145	457	13,2	1,2	0	NA	1	0	0	0	0	E	1	1	1
55	91	F	142	161	NA	18,7	1,6	1	M	1	0	0	0	0	E	0	1	0
56	87	F	267	187	3862	7,9	0,8	1	NSP	1	1	1	0	1	L puis E	1	1	1
57	79	F	867	126	344	0,7	0,1	1	M	1	0	1	0	0	E	1	NA	0
58	82	F	1290	130	NA	15,5	1,9	1	M	1	1	1	0	1	E	1	1	1
59	76	M	56	143	253	9,6	0,8	1	P	1	1	0	0	0	E	0	1	0
60	84	M	239	18	541	11,7	0,7	1	P	1	0	0	1	0	NSP	0	1	0
61	49	F	137	200	277	4,7	0,8	1	M	1	1	1	0	0	E	1	1	0
62	87	M	57	199	NF	19,9	3,6	1	M	1	0	0	1	1	E	0	1	0
63	79	M	22	2	1368	4	0,5	0	NA	0	1	0	0	0	E	0	1	0
64	83	M	27	2	0	2,2	0,2	1	P	1	0	0	0	0	L	0	1	0
65	94	F	176	200	252	14,9	1,2	1	P	1	1	0	0	0	L	1	1	1
66	83	F	857	132	NF	1,5	0,1	1	P	1	0	0	0	0	L	0	1	0
67	87	F	158	179	NF	14,5	0,9	1	P	1	1	1	0	0	E	0	1	0
68	80	F	31	108	863	30,3	5,9	1	M	1	1	0	0	0	E	1	1	0
69	75	M	32	60	NF	0,9	0,1	1	M	1	0	0	0	0	L	1	1	0
70	77	F	1019	168	NA	8,5	1	1	P	1	1	0 puis 1	0 puis 1	0 puis 1	E	1	1	1
71	82	M	620	200	454	28	2,8	1	P	1	1	1	0	0	L	1	1	1
72	87	F	260	200	331	31,3	2,9	1	M	1	1	1	0	0	NSP	1	1	1
73	93	F	735	31	NF	0,2	0	1	P	1	1	0	0	0	E	0	1	0
74	83	M	13	151	838	19,7	1,5	1	P	1	1	1	0	0	L	0	1	0
75	80	M	8	2	463	NF	NF	0	NA	1	1	0	1	0	E	NSP	1	1
76	78	F	60	93	104	7,7	0,7	1	M	1	1	0	1	0	E	NSP	0	1

77	63	F	68	162	NF	4,4	0,5	1	NSP	1	1	0	0	1	E	0	1	0
78	72	M	744	200	6262	2,6	0,1	1	M	1	1	0	1	0	E	1	1	1
79	88	M	215	200	NF	15,4	1,7	1	M	1	1	0	0	0	E	0	1	0
80	81	M	83	200	NA	NA	NA	1	M	1	1	1	0	0	E	0	1	0
81	53	M	10	50	NA	4,1	0,4	1	M	1	1	1	1	0	E	1	1	1
82	92	F	11	11	545	10,7	0,5	0	NA	1	1	0	1	0	E	0	1	0
83	82	F	193	200	1147	59,4	14,4	1	M	1	1	1	0	0	E	1	1	0
84	80	M	896	200	448	14,3	1,3	1	M	1	0	1	0	0	E	1	1	1
85	78	F	7	3	149,00	0,20	0,00	0	NA	1	1	0	1	0	E	0	0	1
86	94	M	654	55	NF	2,5	0,2	1	M	1	1	0	0	0	L	1	1	0
87	71	F	156	136	NF	2,3	0,2	1	P	1	1	1	0	1	L	1	1	0

Toutes les données cliniques et biologiques sont résumées dans le tableau ci-dessus. Les abréviations suivantes sont utilisées : NA : non applicable (par absence de prélèvement ou d'information). NSP : ne sait pas (en l'absence d'information clinique). 0 = absence du signe clinique. 1 = présence du signe clinique. P = pauci-bulleux. M = multi-bulleux. E = étendu. L = localisé.

Annexe 7 : Représentation graphique du ratio d'IgE anti-NC16A sur le taux d'IgE totales, en fonction du taux d'IgE totales

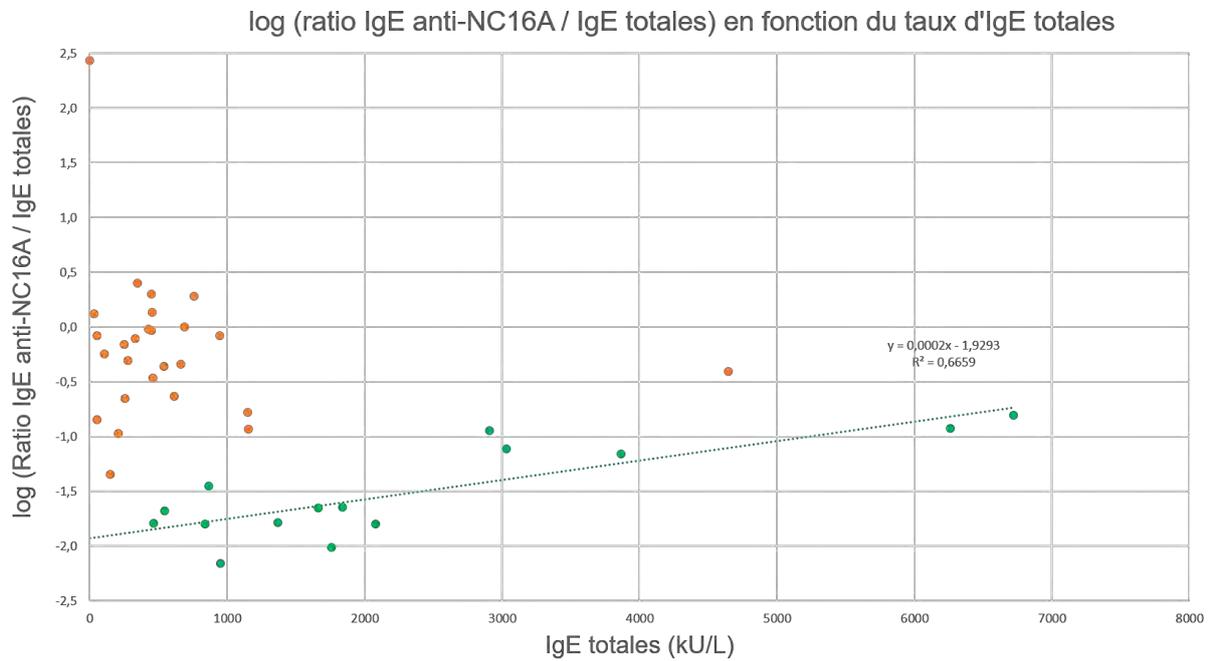


Figure 47 : Représentation en logarithme du ratio IgE anti-NC16A sur IgE totales en fonction du taux d'IgE totales. Les points répartis autour de la droite de régression (en vert) semblent avoir un signal mesuré en ELISA IgE anti-NC16A proportionnel au taux d'IgE totales. Les points situés au dessus ont par contre un signal qui ne dépend clairement pas d'un taux d'IgE totales trop élevé.

Annexe 8 : Répartition des patients en fonction de la présence d'IgG anti-NC16A et de la présentation clinique

N = 86		Bulles	
		Présence	Absence
IgG anti-NC16A	Positif	71	4
	Négatif	6	5

N = 66		Bulles	
		Multi-B	Pauci-B
IgG anti-NC16A	Positif	34	26
	Négatif	0	6

N = 86		Erythème	
		Présence	Absence
IgG anti-NC16A	Positif	74	1
	Négatif	10	1

N = 86		Prurit	
		Présence	Absence
IgG anti-NC16A	Positif	62	14
	Négatif	6	4

N = 86		Urticarien	
		Présence	Absence
IgG anti-NC16A	Positif	30	45
	Négatif	1	10

N = 86		Eczématiforme / Prurigo	
		Présence	Absence
IgG anti-NC16A	Positif	18	57
	Négatif	5	6

N = 86		Atteinte muqueuse	
		Présence	Absence

IgG anti-NC16A	Positif	8	67
	Négatif	0	11

N = 81		Sévérité	
		Sévère	Non sévère
IgG anti-NC16A	Positif	28	43
	Négatif	0	10

N = 86		Intensification thérapeutique	
		Oui	Non
IgG anti-NC16A	Positif	28	47
	Négatif	2	9

N = 72		Localisation	
		Localisée	Etendue
IgG anti-NC16A	Positif	16	48
	Négatif	3	5

Annexe 9 : Valeurs numériques des dosages d'IgE anti-NC16A chez les patients traités par omalizumab

Patient n°	Date du prélèvement	Dates début traitement ou arrêt	Efficacité	IgE anti-NC16A (UA)	IgE totales (kU/L)
1	20.05.2020		Oui	130	4639
1	17.12.2020		Oui	267	3862
1	23.12.2020		Oui	211	3203
1		Début : 24/12/2020			
2	30.11.2020		Oui	896	448
2		Début : 10/12/2020			
2	11.03.2021		Oui	1127	503
2	25.03.2021		Oui	849	NF
3	11.12.2020		Oui	620	454
3	30.12.2020		Oui	145	NF
3		Début : 05/01/2021			
4	11.08.2020		Non	83	457
4	19.10.2020		Non	158	NF
4	26.11.2020		Non	473	968
4		Début : 02/12/2020			
4		STOP janvier 2021			
5	17.12.2019		Non	60	104
5	24.03.2020		Non	478	NF
5		Début : 31/03/2020			
5		STOP 15/04/20			
6	20.01.2021		Non	789	947
	20.01.2021		Non	749	NF
		Début : 21/01/2021			
6		STOP 22/04/2021			
7	21.11.2018		Oui	32	NF
7	02.03.2019		Oui	176	NF
7	04.03.2019		Oui	143	133
7		Début : 01/05/2019			
7		STOP août 2020			
7	25.09.2019		Oui	166	NF
7	09.10.2020		Oui	57	NF
8	11.02.2021		Oui	260	331
8		Début : 19/02/2021			
9	23.02.2021	Début : 23/02/2021		135	1153

10	15.01.2020		Non	744	6262
10	10.03.2020		Non	1718	NF
10		Début : 05/01/2021			
10		STOP 02/04/21			
10	08.04.2021		Non	1913	NF
11		Début : 24/03/2020			
11	12.05.2020		Non	8	463
12	21.05.2020		Non	1290	492
12		Début : 14.12.20			
12		STOP 23.02.21			
12	24.02.2021		Non	922	NF

Bibliographie

1. Daniel BS, Murrell DF. Review of autoimmune blistering diseases: the Pemphigoid diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* sept 2019;33(9):1685-94.
2. Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiai Z, Barbe C, et al. Usefulness of BP230 and BP180-NC16a Enzyme-Linked Immunosorbent Assays in the Initial Diagnosis of Bullous Pemphigoid: A Retrospective Study of 138 Patients. *Arch Dermatol.* 1 mars 2011;147(3):286.
3. Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker E-B, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: Serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *Journal of the American Academy of Dermatology.* avr 2000;42(4):577-83.
4. Dresow SK, Sitaru C, Recke A, Oostingh GJ, Zillikens D, Gibbs BF. IgE autoantibodies against the intracellular domain of BP180. *British Journal of Dermatology.* févr 2009;160(2):429-32.
5. Iwata Y, Komura K, Kodera M, Usuda T, Yokoyama Y, Hara T, et al. Correlation of IgE Autoantibody to BP180 With a Severe Form of Bullous Pemphigoid. *Arch Dermatol.* 1 janv 2008;144(1).
6. Messingham KAN, Noe MH, Chapman MA, Giudice GJ, Fairley JA. A novel ELISA reveals high frequencies of BP180-specific IgE production in bullous pemphigoid. *Journal of Immunological Methods.* juill 2009;346(1-2):18-25.
7. Pomponi D, Di Zenzo G, Zennaro D, Calabresi V, Eming R, Zuzzi S, et al. Detection of IgG and IgE reactivity to BP180 using the ISAC[®] microarray system: Microarray-detected IgG and IgE in bullous pemphigoid. *British Journal of Dermatology.* juin 2013;168(6):1205-14.
8. Yayli S, Pelivani N, Beltraminelli H, Wirthmüller U, Beleznav Z, Horn M, et al. Detection of linear IgE deposits in bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid: a useful clue for diagnosis: Linear IgE deposits in BP and MMP. *British Journal of Dermatology.* nov 2011;165(5):1133-7.
9. Messingham KN, Crowe TP, Fairley JA. The Intersection of IgE Autoantibodies and Eosinophilia in the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid. *Front Immunol.* 4 oct 2019;10:2331.
10. Zone JJ, Taylor T, Hull C, Schmidt L, Meyer L. IgE Basement Membrane Zone Antibodies Induce Eosinophil Infiltration and Histological Blisters in Engrafted Human Skin on SCID Mice. *Journal of Investigative Dermatology.* mai 2007;127(5):1167-74.
11. Hashimoto T, Ohzono A, Teye K, Numata S, Hiroyasu S, Tsuruta D, et al. Detection of IgE autoantibodies to BP180 and BP230 and their relationship to clinical features in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol.* juill 2017;177(1):141-51.
12. Moriuchi R, Nishie W, Ujiiie H, Natsuga K, Shimizu H. In vivo analysis of IgE autoantibodies in bullous pemphigoid: A study of 100 cases. *Journal of Dermatological Science.* avr 2015;78(1):21-5.

13. Fairley JA, Baum CL, Brandt DS, Messingham KAN. Pathogenicity of IgE in autoimmunity: Successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. mars 2009;123(3):704-5.
14. James T, Salman S, Stevenson B, Bundell C, Kelly G, Nolan D, et al. IgE blockade in autoimmunity: Omalizumab induced remission of bullous pemphigoid. *Clinical Immunology*. janv 2019;198:54-6.
15. Lonowski S, Sachsman S, Patel N, Truong A, Holland V. Increasing evidence for omalizumab in the treatment of bullous pemphigoid. *JAAD Case Reports*. mars 2020;6(3):228-33.
16. Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Ologue-Marchan M, Diaz LA, et al. Tight Clustering of Extracellular BP180 Epitopes Recognized by Bullous Pemphigoid Autoantibodies. *Journal of Investigative Dermatology*. oct 1997;109(4):573-9.
17. Shih Y, Wang B, Yuan H, Zheng J, Pan M. Role of BP230 autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Dermatol*. avr 2020;47(4):317-26.
18. Le Saché-de Peuffeilhoux L, Ingen-Housz-Oro S, Hue S, Sbidian E, Valeyrie-Allanore L, Ortonne N, et al. The Value of BP230 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis and Immunological Follow-Up of Bullous Pemphigoid. *Dermatology*. 2012;224(2):154-9.
19. Nakama K, Koga H, Ishii N, Ohata C, Hashimoto T, Nakama T. Clinical and Immunological Profiles of 14 Patients With Bullous Pemphigoid Without IgG Autoantibodies to the BP180 NC16A Domain. *JAMA Dermatol*. 1 mars 2018;154(3):347.
20. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour J-P, et al. Demonstration of Epitope-Spreading Phenomena in Bullous Pemphigoid: Results of a Prospective Multicenter Study. *Journal of Investigative Dermatology*. nov 2011;131(11):2271-80.
21. Hofmann SC, Voith U, Schönau V, Sorokin L, Bruckner-Tuderman L, Franzke C-W. Plasmin Plays a Role in the In Vitro Generation of the Linear IgA Dermatitis Antigen LADB97. *Journal of Investigative Dermatology*. juill 2009;129(7):1730-9.
22. Nishizawa Y, Marcus K, Meyer HE, Butt E, Owaribe K, Hirako Y, et al. The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) Fragments of Bullous Pemphigoid Antigen 180/Type XVII Collagen Have Different N-Termini. *Journal of Investigative Dermatology*. déc 2003;121(6):1554-6.
23. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Wada M, Natsuga K, Ujiie H, et al. Autoantibody Profile Differentiates between Inflammatory and Noninflammatory Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*. nov 2016;136(11):2201-10.
24. Tasanen K. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor-Associated Bullous Pemphigoid. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:10.
25. Sadik CD, Langan EA, Grätz V, Zillikens D, Terheyden P. Checkpoint Inhibition May Trigger the Rare Variant of Anti-LAD-1 IgG-Positive, Anti-BP180 NC16A IgG-Negative Bullous Pemphigoid. *Front Immunol*. 14 août 2019;10:1934.

26. Prost-squarcioni C, Fraitag S, Heller M, Boehm N. Histologie fonctionnelle du derme. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. janv 2008;135(1):5-20.
27. Anatomie fonctionnelle de la peau. microbiologiemedicale.fr. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/peau-anatomie/>
28. Kirfel G, Herzog V. Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma*. juin 2004;223(2-4).
29. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. déc 2013;1833(12):3471-80.
30. Natsuga K, Watanabe M, Nishie W, Shimizu H. Life before and beyond blistering: The role of collagen XVII in epidermal physiology. *Exp Dermatol*. oct 2019;28(10):1135-41.
31. Walko G, Castañón MJ, Wiche G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res*. juin 2015;360(3):529-44.
32. Ingen-Housz-Oro S, Hùe S, Grootenboer-Mignot S, André C. Auto-anticorps des dermatoses bulleuses auto-immunes (pemphigus, pemphigoïde bulleuse) : ce que le dermatologue doit savoir. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. août 2013;140(8-9):563-70.
33. Mueller S, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. A 230-kD Basic Protein Is the Major Bullous Pemphigoid Antigen. *Journal of Investigative Dermatology*. janv 1989;92(1):33-8.
34. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI. Characterization of bullous pemphigoid antigen: A unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell*. juin 1981;24(3):897-903.
35. Zheng M, Ujiie H, Iwata H, Muramatsu K, Yoshimoto N, Ito T, et al. Characteristics of IgG subclasses and complement deposition in BP 230-type bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. mars 2019;33(3):595-600.
36. Kamaguchi M, Iwata H. The Diagnosis and Blistering Mechanisms of Mucous Membrane Pemphigoid. *Front Immunol*. 24 janv 2019;10:34.
37. Koga H, Prost-Squarcioni C, Iwata H, Jonkman MF, Ludwig RJ, Bieber K. Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update. *Front Med*. 10 janv 2019;5:362.
38. Dainichi T, Kurono S, Ohyama B, Ishii N, Sanzen N, Hayashi M, et al. Anti-laminin gamma-1 pemphigoid. *PNAS*. 24 févr 2009;106(8):2800-5.
39. Dainichi T, Koga H, Tsuji T, Ishii N, Ohyama B, Ueda A, et al. From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin γ 1 pemphigoid. *The Journal of Dermatology*. mars 2010;37(3):231-8.
40. Holtsche MM, Goletz S, Zillikens D. Anti-p200-Pemphigoid. *Hautarzt*. avr 2019;70(4):271-6.
41. Franzke C-W, Tasanen K, Borradori L, Huotari V, Bruckner-Tuderman L. Shedding of Collagen XVII/BP180. *Journal of Biological Chemistry*. juin 2004;279(23):24521-9.

42. Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin $\alpha 6\beta 4$ important for hemidesmosome assembly. *Journal of Cell Science*. 15 janv 2003;116(2):387-99.
43. Liu Y, Li L, Xia Y. BP180 Is Critical in the Autoimmunity of Bullous Pemphigoid. *Front Immunol*. 8 déc 2017;8:1752.
44. Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and Primary Structural Analysis of the Bullous Pemphigoid Autoantigen BP180. *Journal of Investigative Dermatology*. sept 1992;99(3):243-50.
45. COL17A1 Gene - GeneCards | COHA1 Protein | COHA1 Antibody. Disponible sur: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL17A1>
46. Tissue expression of COL17A1 - Summary - The Human Protein Atlas. Disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000065618-COL17A1/tissue>
47. Liu Z. Bullous Pemphigoid: Using Animal Models to Study the Immunopathology. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. janv 2004;9(1):41-6.
48. Nishimura M, Nishie W, Shirafuji Y, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, et al. Extracellular cleavage of collagen XVII is essential for correct cutaneous basement membrane formation. *Hum Mol Genet*. 15 janv 2016;25(2):328-39.
49. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, et al. Antibodies to Pathogenic Epitopes on Type XVII Collagen Cause Skin Fragility in a Complement-Dependent and -Independent Manner. *Jl*. 1 juin 2012;188(11):5792-9.
50. Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke C-W, Hofmann SC, et al. Ectodomain Shedding Generates Neoepitopes on Collagen XVII, the Major Autoantigen for Bullous Pemphigoid. *Jl*. 15 oct 2010;185(8):4938-47.
51. Zimina EP, Hofmann SC, Fritsch A, Kern JS, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L. Bullous Pemphigoid Autoantibodies Preferentially Recognize Phosphoepitopes in Collagen XVII. *Journal of Investigative Dermatology*. nov 2008;128(11):2736-9.
52. Franzke C-W, Has C, Schulte C, Huilaja L, Tasanen K, Aumailley M, et al. C-terminal Truncation Impairs Glycosylation of Transmembrane Collagen XVII and Leads to Intracellular Accumulation. *Journal of Biological Chemistry*. oct 2006;281(40):30260-8.
53. Nishie W, Natsuga K, Iwata H, Izumi K, Ujiie H, Toyonaga E, et al. Context-Dependent Regulation of Collagen XVII Ectodomain Shedding in Skin. *The American Journal of Pathology*. mai 2015;185(5):1361-71.
54. Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ. The 97kDa Linear IgA Bullous Disease Antigen Is Identical to a Portion of the Extracellular Domain of the 180kDa Bullous Pemphigoid Antigen, BPAg2. *Journal of Investigative Dermatology*. mars 1998;110(3):207-10.
55. Song J, Tan H, Perry AJ, Akutsu T, Webb GI, Whisstock JC, et al. PROSPER: An Integrated Feature-Based Tool for Predicting Protease Substrate Cleavage Sites. *PLoS One*. 29 nov 2012;7(11):e50300.

56. Lin L, Betsuyaku T, Heimbach L, Li N, Rubenstein D, Shapiro SD, et al. Neutrophil elastase cleaves the murine hemidesmosomal protein BP180/type XVII collagen and generates degradation products that modulate experimental bullous pemphigoid. *Matrix Biology*. janv 2012;31(1):38-44.
57. Liu Z, Michael Shipley J, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, et al. Gelatinase B-deficient Mice Are Resistant to Experimental Bullous Pemphigoid. *Journal of Experimental Medicine*. 3 août 1998;188(3):475-82.
58. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker E-B, Opdenakker G, et al. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol*. déc 2004;204(5):519-27.
59. Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, Van der Meer JB, Jonkman MF. Bullous Pemphigoid and Linear IgA Dermatitis Sera Recognize a Similar 120-kDa Keratinocyte Collagenous Glycoprotein with Antigenic Cross-Reactivity to BP180. *Journal of Investigative Dermatology*. avr 1997;108(4):423-9.
60. Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, et al. C-Terminal Processing of Collagen XVII Induces Neoepitopes for Linear IgA Dermatitis Autoantibodies. *Journal of Investigative Dermatology*. déc 2017;137(12):2552-9.
61. Yamauchi T, Matsushita S, Hashimoto T, Hirako Y. Major cleavage-dependent epitopes for linear IgA bullous dermatosis are formed at the boundary between the non-collagenous 16A and collagenous 15 domains of BP180. *Journal of Dermatological Science*. oct 2014;76(1):25-33.
62. Peter Marinkovich M, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ. LAD-1, the Linear IgA Bullous Dermatitis Autoantigen, Is a Novel 120-kDa Anchoring Filament Protein Synthesized by Epidermal Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. avr 1996;106(4):734-8.
63. Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D, et al. Cicatricial Pemphigoid Autoantibodies React with Multiple Sites on the BP180 Extracellular Domain. *Journal of Investigative Dermatology*. janv 1996;106(1):141-6.
64. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Brocker E-B, et al. Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol*. nov 2001;145(5):778-83.
65. Zone JJ, Taylor TB, Kadunce DP, Meyer LJ. Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *J Clin Invest*. 1 mars 1990;85(3):812-20.
66. Lee JB, Liu Y, Hashimoto T. Cicatricial pemphigoid sera specifically react with the most C-terminal portion of BP180. *Journal of Dermatological Science*. juin 2003;32(1):59-64.
67. Egan CA, Taylor TB, Petersen MJ, Meyer LJ, Zone JJ. Bullous Pemphigoid Sera that Contain Antibodies to BPAg2 also Contain Antibodies to LABD97 that Recognize

- Epitopes Distal to the NC16A Domain. *Journal of Investigative Dermatology*. févr 1999;112(2):148-52.
68. Nishie W. Collagen XVII Processing and Blistering Skin Diseases. *Acta Derm Venerol*. 2020;100(5):adv00054-107.
 69. Genovese G, Di Zenzo G, Cozzani E, Berti E, Cugno M, Marzano AV. New Insights Into the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid: 2019 Update. *Front Immunol*. 2 juill 2019;10:1506.
 70. Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 23 mai 2016;11(1):175-97.
 71. Ingen-Housz-Oro S. Pemphigoïde de la grossesse : revue de la littérature. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. mars 2011;138(3):209-13.
 72. Chorzelski TP. Herpes Gestationis With Identical Lesions in the Newborn: Passive Transfer of the Disease? *Arch Dermatol*. 1 août 1976;112(8):1129.
 73. Hertz KC, Katz SI, Aaronson C. Juvenile Dermatitis Herpetiformis: An Immunologically Proven Case. *Pediatrics*. 1 juin 1977;59(6):945-8.
 74. Vassileva S, Drenovska K, Manuelyan K. Autoimmune blistering dermatoses as systemic diseases. *Clinics in Dermatology*. mai 2014;32(3):364-75.
 75. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*. 21 déc 2017;3(1):17026.
 76. Bernard P, Charneux J. Pemphigoïde bulleuse : revue de la littérature. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. mars 2011;138(3):173-81.
 77. Bernard P. Incidence and Distribution of Subepidermal Autoimmune Bullous Skin Diseases in Three French Regions. *Arch Dermatol*. 1 janv 1995;131(1):48.
 78. Beek N van, Weidinger A, Schneider SW, Kleinheinz A, Gläser R, Holtsche MM, et al. Incidence of pemphigoid diseases in Northern Germany in 2016 – first data from the Schleswig-Holstein Registry of Autoimmune Bullous Diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2021;35(5):1197-202.
 79. Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot MF, Saiag P, Tancrede-Bohin E, et al. Prediction of Survival for Patients With Bullous Pemphigoid: A Prospective Study. *Arch Dermatol*. 1 juin 2005;141(6).
 80. Joly P, Fontaine J, Roujeau J-C. The Role of Topical Corticosteroids in Bullous Pemphigoid in the Elderly: *Drugs & Aging*. 2005;22(7):571-6.
 81. Vaillant L. Evaluation of Clinical Criteria for Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Arch Dermatol*. 1 sept 1998;134(9):1075.
 82. Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical Features and Practical Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. mai 2012;32(2):217-32.

83. Geai info n°6 fr. Disponible sur: <https://health-articles.net/g/geai-lesautoanticorps.fr2.html>
84. Emtenani S, Yuan H, Lin C, Pan M, Hundt JE, Schmidt E, et al. Normal human skin is superior to monkey oesophagus substrate for detection of circulating BP 180- NC 16A-specific IgG antibodies in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. mai 2019;180(5):1099-106.
85. Tsujiabe Y, Akiyama M, Yamanaka Y, Kikuchi T, Satomatsumura K, Shimizu H. Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science*. mars 2005;37(3):145-9.
86. Gary A, Carvalho P, Louison J-B, Helot M-F, Gilbert D, Bernard P, et al. Analyse des signes cliniques des malades atteints de pemphigoïde en fonction des antigènes reconnus par leur sérum en immunotransfert. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. avr 2004;131(4):333-7.
87. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science*. déc 2002;30(3):224-32.
88. Matsumura K, Amagai M, Nishikawa T, Hashimoto T. The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16a domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen. *Arch Dermatol Res*. août 1996;288(9):507-9.
89. Bernard P, Bedane C, Bonnetblanc J-M. Anti-BP180 autoantibodies as a marker of poor prognosis in bullous pemphigoid: a cohort analysis of 94 elderly patients. *British Journal of Dermatology*. mai 1997;136(5):694-8.
90. Bernard P, Reguiat Z, Tancrede-Bohin E, Cordel N, Plantin P, Pauwels C, et al. Risk Factors for Relapse in Patients With Bullous Pemphigoid in Clinical Remission: A Multicenter, Prospective, Cohort Study. *Arch Dermatol*. 1 mai 2009;145(5).
91. Roujeau J-C, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P. High Risk of Death in Elderly Patients With Extensive Bullous Pemphigoid. *Arch Dermatol*. 1 avr 1998;134(4):465.
92. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science*. janv 2006;41(1):21-30.
93. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, et al. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clinical Immunology*. sept 2008;128(3):415-26.
94. Matsumura K, Amagai M, Nishikawa T, Hashimoto T. The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16a domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen. :3.

95. Joly P, Roujeau J-C, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E, et al. A Comparison of Oral and Topical Corticosteroids in Patients with Bullous Pemphigoid. *N Engl J Med*. 31 janv 2002;346(5):321-7.
96. Wojnarowska F, Kirtschig G, Highet AS, Venning VA, Khumalo NP. Guidelines for the management of bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. août 2002;147(2):214-21.
97. Bieber K, Ludwig R. Drug Development in Pemphigoid Diseases. *Acta Derm Venerol*. 2020;100(5):adv00055-114.
98. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shimizu H. What's new in bullous pemphigoid. *The Journal of Dermatology*. mars 2010;37(3):194-204.
99. Pezzolo E, Naldi L. Epidemiology of major chronic inflammatory immune-related skin diseases in 2019. *Expert Review of Clinical Immunology*. 1 févr 2020;16(2):155-66.
100. Hiroyasu S, Turner CT, Richardson KC, Granville DJ. Proteases in Pemphigoid Diseases. *Front Immunol*. 26 juin 2019;10:1454.
101. Sams WM, Gleich GJ. Failure to Transfer Bullous Pemphigoid with Serum from Patients. *Experimental Biology and Medicine*. 1 avr 1971;136(4):1027-31.
102. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest*. 1 nov 1993;92(5):2480-8.
103. Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, et al. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest*. 1 sept 1997;100(5):1256-63.
104. Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ, et al. A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest*. 1 janv 2000;105(1):113-23.
105. Li Q, Ujiie H, Shibaki A, Wang G, Moriuchi R, Qiao H, et al. Human IgG1 Monoclonal Antibody against Human Collagen 17 Noncollagenous 16A Domain Induces Blisters via Complement Activation in Experimental Bullous Pemphigoid Model. *Jl*. 15 déc 2010;185(12):7746-55.
106. Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, et al. Humanization of autoantigen. *Nat Med*. mars 2007;13(3):378-83.
107. Liu Z, Sui W, Zhao M, Li Z, Li N, Thresher R, et al. Subepidermal blistering induced by human autoantibodies to BP180 requires innate immune players in a humanized bullous pemphigoid mouse model. *Journal of Autoimmunity*. déc 2008;31(4):331-8.
108. Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, et al. Bullous Pemphigoid Autoantibodies Directly Induce Blister Formation without Complement Activation. *Jl*. 1 nov 2014;193(9):4415-28.

109. Hiroyasu S, Ozawa T, Kobayashi H, Ishii M, Aoyama Y, Kitajima Y, et al. Bullous Pemphigoid IgG Induces BP180 Internalization via a Macropinocytic Pathway. *The American Journal of Pathology*. mars 2013;182(3):828-40.
110. Iwata H, Kamaguchi M, Ujiie H, Nishimura M, Izumi K, Natsuga K, et al. Macropinocytosis of type XVII collagen induced by bullous pemphigoid IgG is regulated via protein kinase C. *Lab Invest*. déc 2016;96(12):1301-10.
111. Wada M, Nishie W, Ujiie H, Izumi K, Iwata H, Natsuga K, et al. Epitope-Dependent Pathogenicity of Antibodies Targeting a Major Bullous Pemphigoid Autoantigen Collagen XVII/BP180. *Journal of Investigative Dermatology*. mai 2016;136(5):938-46.
112. Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, et al. Epitope Spreading: Lessons From Autoimmune Skin Diseases. *Journal of Investigative Dermatology*. févr 1998;110(2):103-9.
113. Didona D, Di Zenzo G. Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Front Immunol*. 17 avr 2018;9:779.
114. Di Zenzo G, Calabresi V, Olsz EB, Zambruno G, Yancey KB. Sequential Intramolecular Epitope Spreading of Humoral Responses to Human BPAG2 in a Transgenic Model. *Journal of Investigative Dermatology*. avr 2010;130(4):1040-7.
115. Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, Mastrogiacomo A, Sera F, et al. Characterization of the Anti-BP180 Autoantibody Reactivity Profile and Epitope Mapping in Bullous Pemphigoid Patients *Journal of Investigative Dermatology*. janv 2004;122(1):103-10.
116. Mariotti F, Grosso F, Terracina M, Ruffelli M, Cordiali-Fei P, Sera F, et al. Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. *Br J Dermatol*. nov 2004;151(5):1004-10.
117. Kiss M, Husz S, Jánossy T, Marczinovits I, Molnár J, Korom I, et al. Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230. *Journal of Autoimmunity*. févr 2005;24(1):1-10.
118. Alarcon-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature*. janv 1978;271(5640):67-9.
119. Alarcón-Segovia D, Llorente L, Ruíz-Argüelles A. The Penetration of Autoantibodies into Cells May Induce Tolerance to Self by Apoptosis of Autoreactive Lymphocytes and Cause Autoimmune Disease by Dysregulation and/or Cell Damage. *Journal of Autoimmunity*. avr 1996;9(2):295-300.
120. Haeberle S, Wei X, Bieber K, Goletz S, Ludwig RJ, Schmidt E, et al. Regulatory T-cell deficiency leads to pathogenic bullous pemphigoid antigen 230 autoantibody and autoimmune bullous disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. déc 2018;142(6):1831-1842.e7.
121. Laffitte E, Skaria M, Jaunin F, Tamm K, Saurat J-H, Favre B, et al. Autoantibodies to the extracellular and intracellular domain of bullous pemphigoid 180, the putative key

- autoantigen in bullous pemphigoid, belong predominantly to the IgG1 and IgG4 subclasses. *Br J Dermatol.* avr 2001;144(4):760-8.
122. Bird P, Friedmann PS, Ling N, Bird AG, Thompson RA. Subclass Distribution of IgG Autoantibodies in Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology.* janv 1986;86(1):21-5.
 123. Dainichi T, Nishie W, Yamagami Y, Sonobe H, Ujiie H, Kaku Y, et al. Bullous pemphigoid suggestive of complement-independent blister formation with anti- BP 180 IgG4 autoantibodies. *Br J Dermatol.* juill 2016;175(1):187-90.
 124. Schmidt E, Reimer S, Jainta S, Bröcker E-B, Zillikens D, Kruse N, et al. Autoantibodies to BP180 Associated with Bullous Pemphigoid Release Interleukin-6 and Interleukin-8 from Cultured Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology.* nov 2000;115(5):842-8.
 125. Dainichi T, Chow Z, Kabashima K. IgG4, complement, and the mechanisms of blister formation in pemphigus and bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science.* déc 2017;88(3):265-70.
 126. Zuo Y, Evangelista F, Culton D, Guilabert A, Lin L, Li N, et al. IgG4 autoantibodies are inhibitory in the autoimmune disease bullous pemphigoid. *Journal of Autoimmunity.* sept 2016;73:111-9.
 127. Christophoridis S, Büdinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *British Journal of Dermatology.* août 2000;143(2):349-55.
 128. Dimson OG, Giudice GJ, Fu CL, Van den Bergh F, Warren SJ, Janson MM, et al. Identification of a Potential Effector Function for IgE Autoantibodies in the Organ-Specific Autoimmune Disease Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology.* mai 2003;120(5):784-8.
 129. Delaporte E, Dubost-Brama A, Ghohestani R, Nicolas JF, Neyrinck JL, Bergoend H, et al. IgE autoantibodies directed against the major bullous pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. *The Journal of Immunology.* 15 oct 1996;157(8):3642-7.
 130. Bowszyc-Dmochowska M, Dmochowski M. Immediate hypersensitivity phenomena in bullous pemphigoid: critical concepts. *J Med.* 2002;33(1-4):189-98.
 131. Arbesman CE. IgE Levels in Sera of Patients With Pemphigus or Bullous Pemphigoid. 1974.
 132. Saniklidou AH, Tighe PJ, Fairclough LC, Todd I. IgE autoantibodies and their association with the disease activity and phenotype in bullous pemphigoid: a systematic review. *Arch Dermatol Res.* janv 2018;310(1):11-28.
 133. Fairley JA, Fu CL, Giudice GJ. Mapping the Binding Sites of Anti-BP180 Immunoglobulin E Autoantibodies in Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology.* sept 2005;125(3):467-72.

134. Fairley JA, Burnett CT, Fu C-L, Larson DL, Fleming MG, Giudice GJ. A Pathogenic Role for IgE in Autoimmunity: Bullous Pemphigoid IgE Reproduces the Early Phase of Lesion Development in Human Skin Grafted to nu/nu Mice. *Journal of Investigative Dermatology*. nov 2007;127(11):2605-11.
135. van Beek N, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. IgE-mediated mechanisms in bullous pemphigoid and other autoimmune bullous diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*. 3 mars 2016;12(3):267-77.
136. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. févr 2010;125(2):S73-80.
137. Ishiura N, Fujimoto M, Watanabe R, Nakashima H, Kuwano Y, Yazawa N, et al. Serum levels of IgE anti-BP180 and anti-BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science*. févr 2008;49(2):153-61.
138. van Beek N, Lüttmann N, Huebner F, Recke A, Karl I, Schulze FS, et al. Correlation of Serum Levels of IgE Autoantibodies Against BP180 With Bullous Pemphigoid Disease Activity. *JAMA Dermatol*. 1 janv 2017;153(1):30.
139. Kamata A, Kurihara Y, Funakoshi T, Takahashi H, Kuroda K, Hachiya T, et al. Basement membrane zone IgE deposition is associated with bullous pemphigoid disease severity and treatment results. *Br J Dermatol*. mai 2020;182(5):1221-7.
140. Ma L, Wang M, Wang X, Chen X, Zhu X. Circulating IgE anti-BP180 autoantibody and its correlation to clinical and laboratorial aspects in bullous pemphigoid patients. *Journal of Dermatological Science*. avr 2015;78(1):76-7.
141. Provost TT, Tomasi TB. Immunopathology of bullous pemphigoid. Basement membrane deposition of IgE, alternate pathway components and fibrin. *Clin Exp Immunol*. oct 1974;18(2):193-200.
142. Aurora Parodi, A. Rebora. Serum IgE antibodies bind to the epidermal side of the basement membrane zone splits in bullous pemphigoid. 1992.
143. Messingham KN, Holahan HM, Frydman AS, Fullenkamp C, Srikantha R, Fairley JA. Human Eosinophils Express the High Affinity IgE Receptor, FcεRI, in Bullous Pemphigoid. Zhang J, éditeur. *PLoS ONE*. 25 sept 2014;9(9):e107725.
144. Amber KT, Valdebran M, Kridin K, Grando SA. The Role of Eosinophils in Bullous Pemphigoid: A Developing Model of Eosinophil Pathogenicity in Mucocutaneous Disease. *Front Med*. 10 juill 2018;5:201.
145. Gore Karaali M, Koku Aksu AE, Cin M, Leblebici C, Kara Polat A, Gurel MS. Tissue eosinophil levels as a marker of disease severity in bullous pemphigoid. *Australas J Dermatol* mai 2021;62(2)
146. Freire PC, Muñoz CH, Stingl G. IgE autoreactivity in bullous pemphigoid: eosinophils and mast cells as major targets of pathogenic immune reactants. *Br J Dermatol*. déc 2017;177(6):1644-53.

147. Lin L, Hwang B-J, Culton DA, Li N, Burette S, Koller BH, et al. Eosinophils Mediate Tissue Injury in the Autoimmune Skin Disease Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*. mai 2018;138(5):1032-43.
148. Messingham KN, Srikantha R, DeGueme AM, Fairley JA. FcR-Independent Effects of IgE and IgG Autoantibodies in Bullous Pemphigoid. *Jl*. 1 juill 2011;187(1):553-60.
149. Ujiie H. IgE autoantibodies in bullous pemphigoid: Supporting role, or leading player? *Journal of Dermatological Science*. avr 2015;78(1):5-10.
150. Kamiya K, Aoyama Y, Noda K, Miyake T, Yamaguchi M, Hamada T, et al. Possible correlation of IgE autoantibody to BP180 with disease activity in bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science*. avr 2015;78(1):77-9.
151. Kalowska M, Ciepiela O, Kowalewski C, Demkow U, Schwartz R, Wozniak K. Enzyme-linked Immunoassay Index for Anti-NC16a IgG and IgE Auto-antibodies Correlates with Severity and Activity of Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venerol*. 2016;96(2):191-6.
152. Fania L, Caldarola G, Müller R, Brandt O, Pellicano R, Feliciani C, et al. IgE recognition of bullous pemphigoid (BP)180 and BP230 in BP patients and elderly individuals with pruritic dermatoses. *Clinical Immunology*. juin 2012;143(3):236-45.
153. Ghohestani RF, Cozzani E, Delaporte E, Nicolas JF, Parodi A, Claudy A. IgE Antibodies in Sera from Patients with Bullous Pemphigoid Are Autoantibodies Preferentially Directed Against the 230-kDa Epidermal Antigen (BP230). *Journal of Clinical Immunology*. 1998;18(3):8.
154. Yu KK, Crew AB, Messingham KAN, Fairley JA, Woodley DT. Omalizumab therapy for bullous pemphigoid. *Journal of the American Academy of Dermatology*. sept 2014;71(3):468-74.
155. Curry JL, Tetzlaff MT, Nagarajan P, Drucker C, Diab A, Hymes SR, et al. Diverse types of dermatologic toxicities from immune checkpoint blockade therapy: Dermatologic toxicities from immune checkpoint blockade. *J Cutan Pathol*. févr 2017;44(2):158-76.
156. Zhao CY, Hwang SJE, Consuegra G, Chou S, Fernandez-Peñas P. Anti-programmed cell death-1 therapy-associated bullous disorders: a systematic review of the literature. *Melanoma Research*. déc 2018;28(6):491-501.
157. Naidoo J, Schindler K, Querfeld C, Busam K, Cunningham J, Page DB, et al. Autoimmune Bullous Skin Disorders with Immune Checkpoint Inhibitors Targeting PD-1 and PD-L1. *Cancer Immunol Res*. mai 2016;4(5):383-9.
158. Cardona AF, Ruiz-Patiño A, Zatarain-Barron ZL, Ariza S, Ricaurte L, Rolfo C, et al. Refractory Bullous Pemphigoid in a Patient with Metastatic Lung Adenocarcinoma Treated with Pembrolizumab. *Case Rep Oncol*. 10 mars 2021;14(1):386-90.
159. Lopez AT, Geskin L. A Case of Nivolumab-Induced Bullous Pemphigoid: Review of Dermatologic Toxicity Associated with Programmed Cell Death Protein-1/Programmed Death Ligand-1 Inhibitors and Recommendations for Diagnosis and Management. *The Oncol*. oct 2018;23(10):1119-26.

160. Matsui Y, Makino T, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu T. Detection of IgG antibodies to BP180 NC16a and C-terminal domains and LAD-1 in nivolumab-associated bullous pemphigoid. *European Journal of Dermatology*. oct 2019;29(5):554-5.
161. Miyashita K, Iioka H, Miyagawa F, Ishii N, Hashimoto T, Asada H. A case of bullous pemphigoid with IgG antibodies against LAD-1, but not BP180 NC16a domain or BP230. *European Journal of Dermatology*. mars 2018;28(2):248-50.
162. Juzot C, Sibaud V, Amatore F, Mansard S, Seta V, Jeudy G, et al. Clinical, biological and histological characteristics of bullous pemphigoid associated with anti-PD-1/PD-L1 therapy: A national retrospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. août 2021;35(8).
163. Choi Y, Lee SE, Fukuda S, Hashimoto T, Kim S-C. Mucous membrane pemphigoid with immunoglobulin G autoantibodies against full-length and 120-kDa ectodomain of BP180: Mucous membrane pemphigoid with IgG autoantibodies. *The Journal of Dermatology*. févr 2011;38(2):169-72.
164. Zumelzu C, Alexandre M, Le Roux C, Weber P, Guyot A, Levy A, et al. Mucous Membrane Pemphigoid, Bullous Pemphigoid, and Anti-programmed Death-1/ Programmed Death-Ligand 1: A Case Report of an Elderly Woman With Mucous Membrane Pemphigoid Developing After Pembrolizumab Therapy for Metastatic Melanoma and Review of the Literature. *Front Med*. 27 sept 2018;5:268.
165. Fairley JA, Bream M, Fullenkamp C, Syrbu S, Chen M, Messingham KN. Missing the target: Characterization of bullous pemphigoid patients who are negative using the BP180 enzyme-linked immunosorbant assay. *Journal of the American Academy of Dermatology*. mars 2013;68(3):395-403.
166. Mahmoudi H, Toosi R, Kamyab K, Zillikens D, Schmidt E, Daneshpazhooh M. Bullous pemphigoid with linear lesions and antibodies exclusively against the soluble ectodomain of BP180 (LAD-1). *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. sept 2019;17(9):933-5.
167. Kawaguchi Y, Shimauchi R, Nishibori N, Kawashima K, Oshitani S, Fujiya A, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors-associated bullous pemphigoid: A retrospective study of 168 pemphigoid and 9,304 diabetes mellitus patients. *J Diabetes Investig*. mars 2019;10(2):392-8.
168. Plaquevent M, Tétart F, Fardet L, Ingen-Housz-Oro S, Valeyrie-Allanore L, Bernard P, et al. Higher Frequency of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Intake in Bullous Pemphigoid Patients than in the French General Population. *Journal of Investigative Dermatology*. avr 2019;139(4):835-41.
169. Kridin K, Bergman R. Association of Bullous Pemphigoid With Dipeptidyl-Peptidase 4 Inhibitors in Patients With Diabetes: Estimating the Risk of the New Agents and Characterizing the Patients. *JAMA Dermatol*. 1 oct 2018;154(10):1152.
170. Lindgren O, Varpuluoma O, Tuusa J, Ilonen J, Huilaja L, Kokkonen N, et al. Gliptin-associated Bullous Pemphigoid and the Expression of Dipeptidyl Peptidase-4/CD26 in Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venerol*. 2019;99(6):602-9.

171. García-Díez I, Ivars-Lleó M, López-Aventín D, Ishii N, Hashimoto T, Iranzo P, et al. Bullous pemphigoid induced by dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. Eight cases with clinical and immunological characterization. *Int J Dermatol.* juill 2018;57(7):810-6.
172. Kinyó Á, Hanyecz A, Lengyel Z, Várszegi D, Oláh P, Gyömörei C, et al. Clinical, Laboratory and Histological Features of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Related Noninflammatory Bullous Pemphigoid. *JCM.* 28 avr 2021;10(9):1916.
173. Gaudin O, Seta V, Alexandre M, Bohelay G, Aucouturier F, Mignot-Grootenboer S, et al. Gliptin Accountability in Mucous Membrane Pemphigoid Induction in 24 Out of 313 Patients. *Front Immunol.* 24 mai 2018;9:1030.
174. Izumi K, Nishie W, Beniko M, Shimizu H. A Cross-Sectional Study Comparing the Prevalence of Bullous Pemphigoid Autoantibodies in 275 Cases of Type II Diabetes Mellitus Treated With or Without Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors. *Front Immunol.* 26 juin 2019;10:1439.
175. Nishie W, Tasanen K. Gliptin-Associated Bullous Pemphigoid: A Valuable Model of the Mechanism of Breakdown of Immune Tolerance against BP180. *Journal of Investigative Dermatology.* avr 2019;139(4):755-6.
176. Forssmann U, Stoetzer C, Stephan M, Kruschinski C, Skripuletz T, Schade J, et al. Inhibition of CD26/Dipeptidyl Peptidase IV Enhances CCL11/Eotaxin-Mediated Recruitment of Eosinophils In Vivo. *J Immunol.* 15 juill 2008;181(2):1120-7.
177. Beckert B, Panico F, Pollmann R, Eming R, Banning A, Tikkanen R. Immortalized Human hTert/KER-CT Keratinocytes a Model System for Research on Desmosomal Adhesion and Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *IJMS.* 26 juin 2019;20(13):3113.
178. Smits JPH, Niehues H, Rikken G, van Vlijmen-Willems IMJJ, van de Zande GWHJF, Zeeuwen PLJM, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep.* déc 2017;7(1):11838.
179. Geffré A, Concordet D, Braun J-P, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel: Reference Value Advisor. *Veterinary Clinical Pathology.* mars 2011;40(1):107-12.
180. Nicolas J-F, Cozzani E, Ghohestani R, Peyron E, Thivolet J, Claudy A. Les pemphigus, maladies auto-immunes acquises de l'adhérence des kératinocytes. *médecine/sciences.* 1 févr 2013;11:995.
181. Cozzani E, Di Zenzo G, Gasparini G, Saleme A, Agnoletti A, Vassallo C, et al. Autoantibody Profile of a Cohort of 54 Italian Patients with Linear IgA Bullous Dermatitis: LAD-1 Denoted as a Major Auto-antigen of the Lamina Lucida Subtype. *Acta Derm Venerol.* 2020;0.
182. Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D, et al. The Shed Ectodomain of Collagen XVII/BP180 Is Targeted by Autoantibodies in Different Blistering Skin Diseases. *The American Journal of Pathology.* févr 2000;156(2):685-95.

183. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect. *Transplantation*. 15 sept 2011;92(5):510-5.
184. Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int J Immunogenet*. juin 2013;40(3):171-7.
185. Goldsmith P, Lowe D, Wong C, Howse M, Ridgway D, Hammad A, et al. Investigating complement mediated interference in class I HLA-specific antibodies following renal transplantation. *Transplant Immunology*. oct 2020;62:101310.
186. Louis R, Pilette C, Michel O, Michils A, Brusselle G, Poskin A, et al. Variability in total serum IgE over 1 year in severe asthmatics. *Allergy Asthma Clin Immunol*. déc 2019;15(1):20.
187. Sadik CD, Langan EA, Gutzmer R, Fleischer MI, Loquai C, Reinhardt L, et al. Retrospective Analysis of Checkpoint Inhibitor Therapy-Associated Cases of Bullous Pemphigoid From Six German Dermatology Centers. *Front Immunol*. 23 févr 2021;11:588582.
188. Choi S, Chung K, Kim D. Inhibition of Transforming Growth Factor Beta and Immune Checkpoints Induces a Distinctively Distributed, Severe Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*. 2021;101(6):adv00489.
189. Wiggins CJ, Morris VK, Klimas NK, Nagarajan P, Curry JL, Richards KN. Bullous pemphigoid secondary to bintrafusp alfa, a bifunctional fusion protein targeting TGF-beta and PD-L1. *JAAD Case Reports*. juill 2021;13:23-5.
190. Bose R, Marsh DG, Delespesse G. Anti-idiotypes to anti-Lolp I (Rye) antibodies in allergic and non-allergic individuals. Influence of immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. oct 1986;66(1):231-40.
191. Engeroff P, Plattner K, Storni F, Thoms F, Frias Boligan K, Muerner L, et al. Glycan-specific IgG anti-IgE autoantibodies are protective against allergic anaphylaxis in a murine model. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. avr 2021;147(4):1430-41.
192. Galeotti C, Karnam A, Dimitrov JD, Chevaller A, Kaveri SV, Bayry J. Anti-IgE IgG autoantibodies isolated from therapeutic normal IgG intravenous immunoglobulin induce basophil activation. *Cell Mol Immunol*. avr 2020;17(4):426-9.
193. Assayag M, Moshel S, Kohan M, Berkman N. The effect of omalizumab treatment on the low affinity immunoglobulin E receptor (CD23/fc epsilon RII) in patients with severe allergic asthma. *allergy asthma proc*. 1 janv 2018;39(1):36-42.
194. Didona D, Scarsella L, Fehresti M, Solimani F, Juratli HA, Göbel M, et al. Autoreactive Peripheral Blood T Helper Cell Responses in Bullous Pemphigoid and Elderly Patients With Pruritic Disorders. *Front Immunol*. 25 mars 2021;12:569287.
195. De Pitá O, Frezzolini A, Cianchini G, Ruffelli M, Teofoli P, Puddu P. T-helper 2 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid: role of soluble CD30 (sCD30). *Archives of Dermatological Research*. 15 déc 1997;289(12):667-70.

196. Nakashima H, Fujimoto M, Asashima N, Watanabe R, Kuwano Y, Yazawa N, et al. Serum chemokine profile in patients with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. mars 2007;156(3):454-9.
197. Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Toyama K, Hattori N, Okochi H, et al. Elevated levels of eotaxin and interleukin-5 in blister fluid of bullous pemphigoid: correlation with tissue eosinophilia. *British Journal of Dermatology*. juill 2000;143(1):112-6.
198. Andrea M, Susanna B, Francesca N, Enrico M, Alessandra V. The emerging role of type 2 inflammation in asthma. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2 janv 2021;17(1):63-71.
199. Saleh M, Reedy M, Torok H, Weaver J. Successful treatment of bullous pemphigoid with dupilumab: a case and brief review of the literature. *Dermatology Online Journal*. 2021;27(4).
200. Kaye A, Gordon SC, Deverapalli SC, Her MJ, Rosmarin D. Dupilumab for the Treatment of Recalcitrant Bullous Pemphigoid. *JAMA Dermatol*. 1 oct 2018;154(10):1225.
201. Abdat R, Waldman RA, de Bedout V, Czernik A, Mcleod M, King B, et al. Dupilumab as a novel therapy for bullous pemphigoid: A multicenter case series. *Journal of the American Academy of Dermatology*. juill 2020;83(1):46-52.
202. La pemphigoïde bulleuse, Encyclopédie Orphanet Grand Public Sept 2008 (www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/PemphigoideBulleuse-FRfrPub8663v01.pdf)
203. Maladies Bulleuses Auto-Immunes, Revue de la Littérature, Saskia Oro, Christophe Bedane, Philippe Bernard, Christel Leroux, Catherine Prost, Pascal Joly (<http://www.chu-rouen.fr/crnmba/Maladies%20Bulleuses%20Auto-Immunes.pdf>)
204. Protocole national collège dermato HAS 2020 (https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-05/pnds_pemphigoide_bulleuse_avril_2020_final_2020-05-28_19-23-51_71.pdf)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT par Jean Milhès, le 20 septembre 2021 à la faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

Directeur de thèse : Blancher, Antoine (PU-PH)
Co-directeur de thèse : Fortenfant, Françoise (PH)

MISE AU POINT DE TECHNIQUES DIAGNOSTIQUES DANS LA PEMPHIGOÏDE BULLEUSE : AUTOUR DE LA BP180

La pemphigoïde bulleuse (PB) est une pathologie auto-immune médiée par les anticorps. La cible antigénique principale des auto-anticorps associés à la PB est une protéine de l'hémidesmosome, la BP180. Les techniques disponibles en routine détectent des auto-anticorps d'isotype IgG spécifiques d'une courte séquence de la BP180, le domaine NC16A. Bien que non recherchés en routine, des immunoglobulines d'isotype IgE anti-NC16A, et des IgG spécifiques d'autres épitopes, sont également présents chez certains patients atteints de PB. Nous avons développé un test ELISA pour détecter ces IgE spécifiques, et recherché l'existence de liens entre présence des IgE anti-NC16A, paramètres cliniques et biologiques et réponse thérapeutique à l'omalizumab. Nous avons également mis au point un Western blot permettant la détection d'auto-anticorps d'isotype IgG spécifiques de produits de clivage de la BP180 et recherché la présence de ces auto-anticorps chez des patients atteints de PB iatrogène.

CONCEPTION OF DIAGNOSTIC TESTS IN BULLOUS PEMPHIGOID: ABOUT BP180

Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune disease antibody mediated. Autoantibodies mainly target a hemidesmosomal protein named BP180. Routine laboratory tests only detect antibodies specific of a short sequence of BP180: NC16A domain. BP patients' sera also contain anti-NC16A IgE immunoglobulins and IgG specific of other epitopes, but are rarely dosed. We developed an ELISA test to detect IgE specific of the NC16A domain, and evaluated links between anti-NC16A IgE positivity, some biological and clinical parameters, and therapeutic response to omalizumab. We also developed a Western blot to allow detection of IgG and IgA autoantibodies specific of enzymatic digestion products of the BP180, and mainly found these autoantibodies in patients suffering from iatrogenic BP. Development of these tests, and results of the studies are presented in this manuscript.

MOTS-CLES : Bullous Pemphigoid, BP180, LAD-1, ELISA IgE, omalizumab

DISCIPLINE administrative : DES de Biologie Médicale, Immunologie

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :
Institut Fédératif de Biologie CHU Toulouse
Laboratoire d'immunologie
330, avenue de Grande Bretagne
31059 Toulouse Cedex 9