



**HAL**  
open science

# Étude des mécanismes de reconstitution de l'immunité humorale chez des patients atteints de Pemphigoïde Bulleuse traités par Rituximab

Nicolas Berkani

► **To cite this version:**

Nicolas Berkani. Étude des mécanismes de reconstitution de l'immunité humorale chez des patients atteints de Pemphigoïde Bulleuse traités par Rituximab. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01496328

**HAL Id: dumas-01496328**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01496328>**

Submitted on 27 Mar 2017

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

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

**UNIVERSITE DE ROUEN**  
**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

Année 2016

N°

**THESE**

**pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
**pour le DIPLÔME D'ÉTUDE SECONDAIRE : INNOVATION**  
**PHARMACEUTIQUE RECHERCHE**

Présentée et soutenue publiquement le 18 Octobre 2016

par

*Nicolas BERKANI*

Né(e) le 09/01/1987 à Saint Martin d'Hères

Etude des mécanismes de reconstitution de l'immunité  
humorale chez des patients atteints de Pemphigoïde  
Bulleuse traités par Rituximab.

Membres du jury : *Guenounou Moncef, PUPH, Reims*

*Dieu Bernard, PH, Rouen*

*Favennec Loic, PUPH, Rouen*

*Musette Philippe, PUPH, Rouen*

**L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 - 2016  
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : Professeur Pierre FREGER

ASSESEURS : Professeur Michel GUERBET  
Professeur Benoit VEBER  
Professeur Pascal JOLY  
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

|   |     |  |
|---|-----|--|
| Mr Frédéric ANSELME                           | HCN | Cardiologie  |
| Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR                   | HCN | Chirurgie plastique                                  |
| Mr Fabrice BAUER                              | HCN | Cardiologie  |
| Mme Soumeya BEKRI                             | HCN | Biochimie et biologie moléculaire                    |
| Mr Jacques BENICHO                            | HCN | Bio statistiques et informatique médicale            |
| Mr Jean-Paul BESSOU                           | HCN | Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire            |
| Mme Françoise BEURET-BLANQUART<br>(surnombre) | HCN | Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité                |
| Mr Olivier BOYER                              | UFR | Immunologie  |
| Mr François CARON                             | HCN | Maladies infectieuses et tropicales                  |
| Mr Philippe CHASSAGNE                         | HCN | Médecine interne (gériatrie)                         |
| Mr Vincent COMPERE                            | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale          |
| Mr Antoine CUVELIER                           | HB  | Pneumologie  |
| Mr Pierre CZERNICHOW                          | HCH | Epidémiologie, économie de la santé                  |
| Mr Jean-Nicolas DACHER                        | HCN | Radiologie et imagerie médicale                      |
| Mr Stéfan DARMONI                             | HCN | Informatique médicale et techniques de communication |
| Mr Pierre DECHELOTTE                          | HCN | Nutrition  |
| Mme Danièle DEHESDIN (surnombre)              | HCN | Oto-rhino-laryngologie                               |
| Mr Frédéric DI FIORE                          | CB  | Cancérologie   |
| Mr Fabien DOGUET                              | HCN | Chirurgie Cardio Vasculaire                          |

|                               |     |  |
|-------------------------------|-----|--|
| Mr Jean DOUCET                | SJ  | Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie        |
| Mr Bernard DUBRAY             | CB  | Radiothérapie  |
| Mr Philippe DUCROTTE          | HCN | Hépto-gastro-entérologie                             |
| Mr Frank DUJARDIN             | HCN | Chirurgie orthopédique - Traumatologique             |
| Mr Fabrice DUPARC             | HCN | Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| Mr Eric DURAND                | HCN | Cardiologie  |
| Mr Bertrand DUREUIL           | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale          |
| Mme Hélène ELTCHANINOFF       | HCN | Cardiologie  |
| Mr Thierry FREBOURG           | UFR | Génétique  |
| Mr Pierre FREGER              | HCN | Anatomie - Neurochirurgie                            |
| Mr Jean François GEHANNO      | HCN | Médecine et santé au travail                         |
| Mr Emmanuel GERARDIN          | HCN | Imagerie médicale                                    |
| Mme Priscille GERARDIN        | HCN | Pédopsychiatrie                                      |
| Mr Michel GODIN (surnombre)   | HB  | Néphrologie  |
| M. Guillaume GOURCEROL        | HCN | Physiologie  |
| Mr Philippe GRISE (surnombre) | HCN | Urologie   |
| Mr Dominique GUERROT          | HCN | Néphrologie  |
| Mr Olivier GUILLIN            | HCN | Psychiatrie Adultes                                  |
| Mr Didier HANNEQUIN           | HCN | Neurologie   |
| Mr Fabrice JARDIN             | CB  | Hématologie  |
| Mr Luc-Marie JOLY             | HCN | Médecine d'urgence                                   |
| Mr Pascal JOLY                | HCN | Dermato - Vénérologie                                |
| Mme Annie LAQUERRIERE         | HCN | Anatomie et cytologie pathologiques                  |
| Mr Vincent LAUDENBACH         | HCN | Anesthésie et réanimation chirurgicale               |
| Mr Joël LECHEVALLIER          | HCN | Chirurgie infantile                                  |
| Mr Hervé LEFEBVRE             | HB  | Endocrinologie et maladies métaboliques              |
| Mr Thierry LEQUERRE           | HB  | Rhumatologie   |
| Mme Anne-Marie LEROI          | HCN | Physiologie  |
| Mr Hervé LEVESQUE             | HB  | Médecine interne                                     |
| Mme Agnès LIARD-ZMUDA         | HCN | Chirurgie Infantile                                  |
| Mr Pierre Yves LITZLER        | HCN | Chirurgie cardiaque                                  |
| Mr Bertrand MACE              | HCN | Histologie, embryologie, cytogénétique               |
| M. David MALTETE              | HCN | Neurologie   |
| Mr Christophe MARGUET         | HCN | Pédiatrie  |
| Mme Isabelle MARIE            | HB  | Médecine interne                                     |
| Mr Jean-Paul MARIE            | HCN | Oto-rhino-laryngologie                               |
| Mr Loïc MARPEAU               | HCN | Gynécologie - Obstétrique                            |
| Mr Stéphane MAPRET            | HCN | Pédiatrie  |

|  |     |   |
|--|-----|---|
| Mme Véronique MERLE                      | HCN | Epidémiologie                                   |
| Mr Pierre MICHEL                         | HCN | Hépatogastro-entérologie                        |
| Mr Jean-François MUIR                    | HB  | Pneumologie                                     |
| Mr Marc MURAINÉ                          | HCN | Ophthalmologie                                  |
| Mr Philippe MUsETTE                      | HCN | Dermatologie - Vénérologie                      |
| Mr Christophe PEILLON                    | HCN | Chirurgie générale                              |
| Mr Christian PFISTER                     | HCN | Urologie  |
| Mr Jean-Christophe PLANTIER              | HCN | Bactériologie - Virologie                       |
| Mr Didier PLISSONNIER                    | HCN | Chirurgie vasculaire                            |
| Me Gaëtan PREVOST                        | HCN | Endocrinologie                                  |
| Mr Bernard PROUST                        | HCN | Médecine légale                                 |
| Mr Jean-Christophe RICHARD (détachement) | HCN | Réanimation médicale - Médecine d'urgence       |
| Mr Vincent RICHARD                       | UFR | Pharmacologie                                   |
| Mme Nathalie RIVES                       | HCN | Biologie du développement et de la reproduction |
| Mr Horace ROMAN                          | HCN | Gynécologie - Obstétrique                       |
| Mr Jean-Christophe SABOURIN              | HCN | Anatomie - Pathologie                           |
| Mr Guillaume SAVOYE                      | HCN | Hépatogastrologie                               |
| Mme Céline SAVOYE-COLLET                 | HCN | Imagerie médicale                               |
| Mme Pascale SCHNEIDER                    | HCN | Pédiatrie                                       |
| Mr Michel SCOTTE                         | HCN | Chirurgie digestive                             |
| Mme Fabienne TAMON                       | HCN | Réanimation Médicale                            |
| Mr Luc THIBERVILLE                       | HCN | Pneumologie                                     |
| Mr Christian THUILLEZ                    | HB  | Pharmacologie                                   |
| Mr Hervé TILLY                           | CB  | Hématologie et transfusion                      |
| Mr Olivier TROST                         | HCN | Chirurgie Maxillo Faciale                       |
| Mr Jean-Jacques TUECH                    | HCN | Chirurgie digestive                             |
| Mr Jean-Pierre VANNIER                   | HCN | Pédiatrie génétique                             |
| Mr Benoît VEBER                          | HCN | Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale      |
| Mr Pierre VERA                           | CB  | Biophysique et traitement de l'image            |
| Mr Eric VERIN                            | HB  | Service Santé Réadaptation                      |
| Mr Eric VERSPYCK                         | HCN | Gynécologie obstétrique                         |
| Mr Olivier VITTECOQ                      | HB  | Rhumatologie                                    |
| Mr Jacques WEBER                         | HCN | Physiologie                                     |

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

|                                  |     |                                     |
|----------------------------------|-----|-------------------------------------|
| Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG      | HCN | Bactériologie – Virologie           |
| Mme Carole BRASSE LAGNEL         | HCN | Biochimie                           |
| Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS   | HCN | Chirurgie Vasculaire                |
| Mr Gérard BUCHONNET              | HCN | Hématologie                         |
| Mme Mireille CASTANET            | HCN | Pédiatrie                           |
| Mme Nathalie CHASTAN             | HCN | Physiologie                         |
| Mme Sophie CLAEYSSENS            | HCN | Biochimie et biologie moléculaire   |
| Mr Moïse COEFFIER                | HCN | Nutrition                           |
| Mr Stéphanie DERREY              | HCN | Neurochirurgie                      |
| Mr Manuel ETIENNE                | HCN | Maladies infectieuses et tropicales |
| Mr Serge JACQUOT                 | UFR | Immunologie                         |
| Mr Joël LADNER                   | HCN | Epidémiologie, économie de la santé |
| Mr Jean-Baptiste LATOUCHE        | UFR | Biologie cellulaire                 |
| Mme Fachel MARION-LETELLIER      | UFR | Physiologie                         |
| Mr Thomas MOUREZ                 | HCN | Virologie                           |
| Mme Muriel QUILLARD              | HCN | Biochimie et biologie moléculaire   |
| Mme Christine RONDANINO          | UFR | Physiologie de la Reproduction      |
| Mr Mathieu SALAUN                | HCN | Pneumologie                         |
| Mme Pascale SAUGIER-VEBER        | HCN | Génétique                           |
| Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN | HCN | Anatomie                            |

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

|                      |     |               |
|----------------------|-----|---------------|
| Mme Dominique LANIEZ | UFR | Anglais       |
| Mr Thierry WABLE     | UFR | Communication |

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

|  |                      |
|--|----------------------|
| Mr Thierry BESSON                          | Chimie Thérapeutique |
| Mr Jean-Jacques BONNET                     | Pharmacologie        |
| Mr Roland CAPRON (PU-PH)                   | Biophysique          |
| Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)     | Pharmacologie        |
| Mme Isabelle DUBUS                         | Biochimie            |
| Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)                   | Parasitologie        |
| Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite) | Toxicologie          |
| Mr Michel GUERBET                          | Toxicologie          |
| Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET             | Physiologie          |
| Mme Christelle MONTEIL                     | Toxicologie          |
| Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)           | Microbiologie        |
| Mme Elisabeth SEGUIN                       | Pharmacognosie       |
| Mr Rémi VARIN (PU-PH)                      | Pharmacie clinique   |
| Mr Jean-Marie VAUGEOS                      | Pharmacologie        |
| Mr Philippe VERITE                         | Chimie analytique    |

### MAITRES DE CONFERENCES

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Mme Cécile BARBOT                 | Chimie Générale et Minérale                        |
| Mr Jérémy BELLIEU                 | Pharmacologie                                      |
| Mr Frédéric BOUNOURE              | Pharmacie Galénique                                |
| Mr Abdeslam CHAGRAOUI             | Physiologie  |
| Mme Camille CHARBONNIER           | Statistiques                                       |
| Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB | Législation pharmaceutique et économie de la santé |
| Mme Elizabeth CHOSSON             | Botanique  |
| Mme Cécile CORBIERE               | Biochimie  |
| Mr Eric DITTMAR                   | Biophysique  |
| Mme Nathalie DOURMAP              | Pharmacologie                                      |
| Mme Isabelle DUBUC                | Pharmacologie                                      |
| Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER    | Pharmacologie                                      |



|                            |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| Mr Abdelhakim ELOMRI       | Pharmacognosie               |
| Mr François ESTOUR         | Chimie Organique             |
| Mr Gilles GARGALA (MCU-PH) | Parasitologie                |
| Mme Najla GHARBI           | Chimie analytique            |
| Mme Marie-Laure GROULT     | Botanique                    |
| Mr Hervé HUE               | Biophysique et mathématiques |
| Mme Laetitia LE GOFF       | Parasitologie - Immunologie  |
| Mme Hong LU                | Biologie                     |
| Mme Sabine MENAGER         | Chimie organique             |
| Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT | Chimie analytique            |
| Mr Mohamed SKIBA           | Pharmacie galénique          |
| Mme Malika SKIBA           | Pharmacie galénique          |
| Mme Christine THARASSE     | Chimie thérapeutique         |
| Mr Frédéric ZIEGLER        | Biochimie                    |

#### PROFESSEURS ASSOCIES

|                            |                      |
|----------------------------|----------------------|
| Mme Cécile GUERARD-DETUNCO | Pharmacie officinale |
| Mr Jean-François HOUIVET   | Pharmacie officinale |

#### PROFESSEUR CERTIFIE

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Mme Mathilde GUERIN | Anglais |
|---------------------|---------|

#### ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| Mme Sandrine DAHYOT | Bactériologie |
|---------------------|---------------|

#### ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

|                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| Mr Souleymane ABDOUL-AZIZE | Biochimie        |
| Mme Hanane GASMI           | Galénique        |
| Mme Caroline LAUGEL        | Chimie organique |
| Mr Romy RAZAKANDRAINIBE    | Parasitologie    |

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

|                                   |                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Mme Cécile BARBOT                 | Chimie Générale et minérale         |
| Mr Thierry BESSON                 | Chimie thérapeutique                |
| Mr Roland CAPRON                  | Biophysique                         |
| Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB | Législation et économie de la santé |
| Mme Elisabeth CHOSSON             | Botanique                           |
| Mr Jean-Jacques BONNET            | Pharmacodynamie                     |
| Mme Isabelle DUBUS                | Biochimie                           |
| Mr Loïc FAVENNEC                  | Parasitologie                       |
| Mr Michel GUERBET                 | Toxicologie                         |
| Mr François ESTOUR                | Chimie organique                    |
| Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET      | Physiologie                         |
| Mme Martine PESTEL-CARON          | Microbiologie                       |
| Mme Elisabeth SEGUIN              | Pharmacognosie                      |
| Mr Mohamed SKIBA                  | Pharmacie galénique                 |
| Mr Rémi VARIN                     | Pharmacie clinique                  |
| Mr Philippe VERITE                | Chimie analytique                   |



## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| Mr Sergueï FETISSOV (med) | Physiologie (ADEN)     |
| Mr Paul MULDER (phar)     | Sciences du Médicament |
| Mme Su RUAN (med)         | Génie Informatique     |

### MAITRES DE CONFERENCES

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Mr Sahil ADRIOUCH (med)             | Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905) |
| Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med) | Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)         |
| Mme Carine CLEREN (med)             | Neurosciences (Néovasc)                              |
| Mme Pascaline GAILDRAT (med)        | Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)             |
| Mr Nicolas GUEROUT (med)            | Chirurgie Expérimentale                              |
| Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)    | Physiologie (Unité Inserm 1076)                      |
| Mr Frédéric PASQUET                 | Sciences du langage, orthophonie                     |
| Mme Isabelle TOURNIER (med)         | Biochimie (UMR 1079)                                 |

### CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ - Saint Julien Rouen

## SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



# Remerciements

---

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé dans la mise en œuvre de ce travail au sein de l'U905. Ce laboratoire m'a vu sous tous mes jours bons ou mauvais et je remercie tous les collègues de m'avoir supporté si longtemps. Tout d'abord notre équipe dermatologie. Merci Sébastien pour vos conseils, votre direction et ces discussions où nous étions souvent d'accord. Je ne remerciais jamais assez Natacha qui m'a tout appris et qui s'est occupée de moi quand je commençais la VRAI science. Je remercie aussi Florence et Bassam avec qui nous avons partagés plein de galères et beaucoup de bons moments. J'ai une pensée amicale et fraternelle pour tous les membres de l'équipe rhumatologie que je remercie. Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe muscle pour leur aide, leurs conseils et leur soutien y compris durant ces super séances de biblio. Je remercie tout particulièrement Romain et Gaetan avec lesquels on a plus que travaillé. Ce travail ne serait rien sans l'appui de Mr le Professeur Olivier Boyer qui a toujours su me donner de précieux conseils tant scientifiques qu'humains. Je remercie très vivement Chantal et Reynald pour leur aide et leur bonne humeur et pour tous les repas que l'on a partagé.

Je tiens à remercier Mr le Professeur Mickael Hertl pour son aide scientifique son apport dans ces travaux et ces conseils. Je remercie toutes les personnes que j'ai croisé à l'Institut Pasteur pour leur aide, leur soutien et leurs conseils et tout particulièrement l'équipe de Mme le Professeur Anna Cumano ainsi que tous les membres du Centre de Recherche Translationnel et du Centre d'Immunologie Humaine qui ont toujours trouvé des solutions à mes problèmes.

Je tiens à remercier Mr le Professeur Pascal Joly pour son aide, ces conseils, son soutien, pour m'avoir permis de présenter ces travaux lors du congrès parisien sur les

maladies bulleuses auto-immunes et ainsi me permettre d'échanger et de confronter mes idées avec les plus grands chercheurs à ce sujet.

Je remercie Mr Guenounou d'accepter d'être jury de cette thèse et de venir apporter son savoir en immunologie en venant à Rouen.

Je remercie Mr Dieu d'accepter d'être jury de cette thèse mais aussi pour m'avoir accompagné durant ma première année d'internat en pharmacie à la PUI de Rouen et de m'avoir supervisé pour cette première garde durant laquelle nous avons connu quelques rebondissements.

Je remercie mon directeur de thèse Mr le Professeur Philippe Musette d'avoir toujours cru en mes capacités, de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de m'épanouir dans la science et la recherche, pour toute son aide et ces conseils précieux, merci.

Je remercie mes amis et ma famille pour tout. La vie file à une vitesse... Merci Popé, merci lolo, merci tonton, merci Evelyn, merci Edith, merci Marianne (je pense fort à toi). Merci les copains, PM, Raoul, Aurel, Mathiouz, Gaet encore, Pewere et milles autres qui sauront.

Merci pour tout ma kimette.

Enfin je remercie ceux qui veillent sur moi.

# Table des Matières

---

|   |    |
|---|----|
| Remerciements .....                                     | 1  |
| Table des Matières.....                                 | 5  |
| Liste des Figures .....                                 | 7  |
| Liste des Tableaux.....                                 | 8  |
| Liste des abréviations .....                            | 9  |
| Introduction .....                                      | 10 |
| I. Du système immunitaire à l'auto-immunité.....        | 10 |
| A. Généralités sur le système immunitaire.....          | 10 |
| 1. Description .....                                    | 10 |
| 2. Éléments de régulation du système immunitaire.....   | 13 |
| a. Tolérance centrale .....                             | 14 |
| b. Tolérance périphérique.....                          | 18 |
| i. L'anergie.....                                       | 19 |
| ii. Les Treg.....                                       | 21 |
| iii. Les Breg.....                                      | 22 |
| 3. Introduction à la rupture de tolérance .....         | 26 |
| B. Les Maladies auto-immunes .....                      | 28 |
| 1. Introduction .....                                   | 28 |
| 2. Acteurs de l'auto-immunité.....                      | 30 |
| a. Auto-immunité humorale .....                         | 30 |
| b. Auto-immunité cellulaire.....                        | 32 |
| 3. Maladies auto-immunes spécifiques d'organes.....     | 33 |
| 4. Maladies auto-immunes non spécifiques d'organes..... | 34 |
| 5. Diagnostic.....                                      | 35 |
| 6. Traitements actuelles .....                          | 36 |



|  |     |
|--|-----|
| a. Objectifs des traitements .....   | 36  |
| b. Immunosuppresseurs chimiques.....   | 37  |
| c. Biothérapies .....  | 38  |
| II. Les Maladies auto-immunes bulleuses .....                                  | 43  |
| A. La peau.....  | 43  |
| 1. L'épiderme .....  | 43  |
| 2. La jonction dermo-épidermique .....   | 47  |
| 3. Le derme et l'hypoderme .....   | 48  |
| B. Les maladies auto-immunes de la peau .....                                  | 49  |
| C. Les Maladies auto-immunes bulleuses intra-épidermiques : les Pemphigus..... | 51  |
| 1. Clinique .....  | 51  |
| 2. Physiopathologie .....  | 53  |
| 3. Diagnostic et traitement .....  | 57  |
| D. Les Maladies auto-immunes bulleuses sous épidermiques .....                 | 59  |
| 1. Clinique .....  | 59  |
| 2. Physiopathologie .....  | 61  |
| 3. Diagnostic et traitement .....  | 64  |
| III. Objectifs de Thèse .....  | 66  |
| Résultats .....  | 68  |
| I. Introduction aux résultats des travaux sur la Pemphigoïde Bulleuse .....    | 68  |
| II. Article en préparation .....   | 72  |
| Discussion Générale .....  | 102 |
| Références .....   | 112 |

# Liste des Figures

---

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : La sélection thymique .....  | 16 |
| Figure 2 : La synapse immunologique lors de l'activation lymphocytaire T .....                | 19 |
| Figure 3 : La plasticité des Treg .....   | 22 |
| Figure 4 : Propriétés fonctionnelles des Breg .....   | 23 |
| Figure 5 : Modèle développemental de Breg .....   | 25 |
| Figure 6 : Les différents types d'hypersensibilités .....                                     | 27 |
| Figure 7 : Structure d'un anticorps .....   | 31 |
| Figure 8 : Mécanismes pathogéniques des auto-anticorps .....                                  | 32 |
| Figure 9 : Principe de production d'un anticorps monoclonal .....                             | 40 |
| Figure 10 : Schéma de la composition de la peau .....   | 43 |
| Figure 11 : Illustrations des desmosomes .....  | 45 |
| Figure 12 : Distribution des Dsg1 et Dsg3 dans l'épiderme et les muqueuses .....              | 45 |
| Figure 13 : La jonction dermo-épidermique .....   | 47 |
| Figure 14 : Schéma des molécules constitutives des hémidesmosomes de la JDE .....             | 48 |
| Figure 15 : Lésions du Pemphigus vulgaris .....   | 51 |
| Figure 16 : Lésions du pemphigus foliacé .....  | 52 |
| Figure 17 : Hypothèse physiopathologique de développement du Pemphigus et effets du RTX ..... | 57 |
| Figure 18 : Anato-pathologie du pemphigus .....   | 58 |
| Figure 19 : Lésions des jambes et du tronc de la Pemphigoïde bulleuse .....                   | 60 |
| Figure 20 : Hypothèse physiopathologique du développement de la Pemphigoïde bulleuse .....    | 63 |
| Figure 21 : Anato-pathologie de la Pemphigoïde bulleuse .....                                 | 65 |
| Figure 22 : Présentation de la technologie Biomark Fluidigm .....                             | 69 |

# Liste des Tableaux

---

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1 : Exemples de maladies auto-immunes spécifiques d'organes .....              | 34 |
| Tableau 2 : Exemples de maladies auto-immunes systémiques .....                        | 34 |
| Tableau 3 : Principaux anticorps monoclonaux utilisés dans le traitements de MAI ..... | 41 |

# Liste des abréviations

---

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| ADN : Acide desoxyribo nucléique              | PF : Pemphigus foliacé             |
| AIRE : <i>Autoimmune regulator</i>            | PNP : Pemphigus para-néoplasique   |
| ARN : Acide ribonucléique                     | PR : Polyarthrite rhumatoïde       |
| BCR : <i>B cell receptor</i>                  | PV : Pemphigus <i>vulgaris</i>     |
| BP180 : <i>Bullous pemphigoid antigen 180</i> | RC : Rémission complète            |
| BP230 : <i>Bullous pemphigoid antigen 230</i> | RI : Rémission incomplète          |
| Breg : Lymphocyte B régulateur                | RTX : Rituximab                    |
| CD : <i>Cluster of differentiation</i>        | TCR : <i>T cell receptor</i>       |
| CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité    | TGF : <i>Tumor growth factor</i>   |
| CPA : Cellule présentatrice d'antigènes       | TLR : <i>Toll like receptor</i>    |
| Dsg : Desmogléine                             | TNF : <i>Tumor necrosis factor</i> |
| Fc : Fragment cristallisable                  | Treg : Lymphocyte T régulateur     |
| HLA : <i>Human leucocyte antigen</i>          |                                    |
| IFD : Immunofluorescence directe              |                                    |
| IFI : Immunofluorescence indirecte            |                                    |
| Ig : Immunoglobuline                          |                                    |
| IL : Interleukine                             |                                    |
| INF : Interféron                              |                                    |
| iTreg : Lymphocyte T régulateur induit        |                                    |
| JDE : Jonction dermo-épidermique              |                                    |
| LB : Lymphocyte B                             |                                    |
| LPS : Lipo-polysaccharide                     |                                    |
| LT : Lymphocyte T                             |                                    |
| LTc : Lymphocyte T cytotoxique                |                                    |
| LTh : Lymphocyte T <i>helper</i>              |                                    |
| MAI : Maladie auto-immune                     |                                    |
| MBAI : Maladie bulleuse auto-immune           |                                    |
| NLR : <i>Node like receptor</i>               |                                    |
| nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel       |                                    |
| PB : Pemphigoïde bulleuse                     |                                    |

# Introduction

---

## I. Du système immunitaire à l'auto-immunité

### A. Généralités sur le système immunitaire

#### 1. Description

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme dans le but de maintenir son intégrité. On distingue classiquement 2 composantes : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Très brièvement, le système immunitaire inné correspond aux systèmes de défense non-spécifiques du danger reconnu. Il est composé des différentes barrières de l'organisme (épiderme, muqueuses), de l'acidité gastrique, des cellules phagocytaires ainsi que du système complément. Les cellules phagocytaires sont majoritairement des polynucléaires neutrophiles mais il est aussi retrouvé les éosinophiles, les basophiles, les cellules dendritiques et les monocytes / macrophages. Les lymphocytes *Natural Killer* (NK) sont classés dans l'immunité innée car leur pouvoir cytotoxique s'exerce sur les cellules sans reconnaissance spécifique d'un antigène. Le système immunitaire inné a la particularité d'agir vite contre les agressions, de déclencher une réaction inflammatoire par sécrétion de chimiokines et de cytokines et ainsi recruter et activer les cellules de l'immunité adaptative. Le système immunitaire inné dispose de différents récepteurs aux signaux d'infection et de danger comme les *Toll like receptor* (TLR), les *Nod like receptor* (NLR). Ces récepteurs activent les cellules immunitaires par reconnaissance de motifs communs à différents pathogènes viraux, bactériens ou fongiques comme le lipo-polysaccharide (LPS) des bactéries Gram-, le peptidoglycane des bactéries Gram+, l'acide ribonucléique (ARN), l'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin ou encore les motifs osidiques de type mannans de certains champignons. Le répertoire inné

reconnu est le fruit de millions d'années de sélection de motifs pathogènes et d'évolution des espèces. Ce répertoire est donc limité et statique et ne peut pas s'adapter aux mutations microbiennes à l'échelle de l'individu.

Le système immunitaire adaptatif, au contraire est composé des cellules ayant la capacité d'orchestrer une réponse immunitaire complexe dirigée spécifiquement contre l'agent de danger grâce à un récepteur spécifique à cet antigène. Ce récepteur spécifique de l'antigène est appelé *B cell receptor* (BCR) chez les Lymphocytes B (LB) et *T cell receptor* (TCR) chez les Lymphocytes T (LT). Ces récepteurs sont issus de la recombinaison aléatoire de plusieurs gènes composant les chaînes protéiques de ces récepteurs. Ce système de recombinaison permet théoriquement la synthèse d'une infinité de récepteurs différents qui subiront encore des étapes de maturation chez les LB. Le répertoire antigénique lymphocytaire peut donc s'adapter à tous type d'antigène et évoluer avec les mutations microbiennes pour éviter l'échappement. Cette réponse nécessite des signaux d'activation transmis par l'immunité innée ainsi qu'une collaboration complexe contact-dépendante entre les cellules de l'immunité adaptative. Les acteurs du système immunitaire adaptatif sont les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes. Très brièvement, toutes les cellules nucléées présentent des antigènes peptidiques via leur Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) autrement dit *Human Leucocyte Antigen* (HLA) chez l'humain. Il existe 2 classes majeures de CMH : CMH classe I et CMH de classe II. Le CMH de classe I est le complexe protéique présent sur toutes les cellules nucléées et permet de présenter aux lymphocytes des peptides endogènes, c'est-à-dire issus de la traduction d'un gène de la cellule. Le CMH de classe II ne se retrouve que sur un type cellulaire particulier : les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA). Ces cellules sont les cellules dendritiques, les LB et les monocytes / macrophages. Elles phagocytent des antigènes, les digèrent dans des lysosomes et apprêtent ces peptides dans le CMH de classe II pour le présenter aux LT. Il existe 2

grandes familles de lymphocytes : les Lymphocytes B et les lymphocytes T. Le LB, durant sa maturation, va acquérir un récepteur à l'antigène (BCR) par recombinaison de gènes qui sera capable de reconnaître un antigène soluble. La fixation de l'antigène au BCR va induire son internalisation, sa digestion et la présentation de peptides issus de l'antigène via le CMH de classe II du LB à un LT *helper* (LTh). Les lymphocytes T ont aussi un récepteur antigène spécifique issu de la recombinaison de gènes mais ils ne reconnaissent les peptides que lorsqu'ils sont apprêtés dans un complexe CMH. Ils sont classés en 2 grandes catégories, les LT CD8<sup>+</sup> (LTc) et LT CD4<sup>+</sup> (LTh) en fonction de leur capacité à reconnaître un peptide apprêté dans un CMH de classe I ou II respectivement (Les *clusters of differentiation* (CD) définissent des groupes de cellules en fonction de l'expression de ces molécules à leur membrane).

Lorsqu'un LTc reconnaît un peptide dans un CMH de classe I via son récepteur spécifique (TCR) et qu'il reçoit un autre signal apporté, par exemple, par des cytokines inflammatoires, il lysera la cellule cible grâce à la libération de différentes enzymes cytotoxiques (granzyme et perforine essentiellement).

Le LTh est le « chef d'orchestre » de la réponse immune adaptative. Il est capable de reconnaître un peptide apprêté dans un CMH de classe II, c'est-à-dire présenté par une CPA. Lorsqu'une CPA présente un peptide issu de la phagocytose d'un agent infectieux, le LTh reconnaît ce complexe et s'active. L'activation d'un LTh permet la mise en place de toutes les réponses immunes en fonction du contexte d'activation de ce LTh. Le contact entre la CPA et le LTh permet la fixation du TCR au complexe peptide/CMH et la reconnaissance de signaux secondaires d'activation (CD28/B7,...) ainsi que la sécrétion de cytokine qui marquera le contexte de danger : ce contact entre cellules s'appelle synapse immunologique. Le LTh pourra alors orienter la réponse en sécrétant différents types de cytokines qui activeront des acteurs immunitaires différents. Le LTh activé de type Th2 mettra en place les programmes de

transcription GATA3 et STAT6 qui lui permettront de sécréter les interleukines (IL) IL-3, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 (pour les majoritaires). Ces cytokines vont activer les LB dont les BCR interagissent avec un antigène. Les LB activés vont proliférer et se différencier en LB mémoire et plasmocytes sécréteur d'anticorps après avoir modifié son BCR pour augmenter son affinité pour l'antigène suite au phénomène d'hypermutation somatique et changer d'isotype pour sécréter l'immunoglobuline (Ig) appropriée, d'abord IgM puis IgG, IgA ou IgE. Ce type de réponse est efficace contre les agents extracellulaires comme une majorité de bactérie et de parasites. À cette réponse Th2 on oppose souvent la réponse Th1. Dans ce cas le LTh exprimera le facteur de transcription T-bet et sécrétera les cytokines IL-2, *Tumor necrosis factor alpha* (TNFa), interféron alpha et beta (INF) essentiellement. Ces cytokines vont activer les LTc pour qu'ils puissent proliférer et lyser les cellules qui présenteront des antigènes exogènes via leur CMH de classe I. Cette réponse est efficace contre les pathogènes intracellulaires comme les virus essentiellement mais aussi contre les cellules tumorales qui présentent alors des peptides altérés qui signent le danger cancéreux. Il existe d'autres types d'activation comme Th3, Th9 et Th17 qui sont des réponses minoritaires caractérisées par la sécrétion d'autres cytokines qui activeront des acteurs immuns différents.

## 2. Éléments de régulation du système immunitaire

Le système immunitaire s'active en présence d'antigènes infectieux grâce aux récepteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Les récepteurs de l'immunité innée reconnaissent des motifs non spécifiques exogènes. La tolérance de l'immunité innée face au soi est le fruit de centaines de millions d'années d'évolution et de sélection de récepteurs reconnaissant des produits microbiens et non des produits du soi. Il s'agit d'une tolérance passive, le système immunitaire inné ne peut s'activer que devant ces signaux de danger.



Dans l'immunité adaptative, les lymphocytes présentent un récepteur à l'antigène qui est spécifique et issu d'une recombinaison aléatoire de gènes. Cette recombinaison aléatoire, tant chez les LB que chez les LT, ne permet pas de garantir une spécificité de ces récepteurs pour des antigènes exogènes. La question de la reconnaissance d'éléments exogènes : le « non soi » par le système immunitaire et la non activation de ces cellules vis-à-vis d'élément endogène a fait largement débat et différents systèmes de régulation du système immunitaire sont encore à découvrir.

Il est d'abord important de souligner que le LB ne peut normalement s'activer, proliférer et se différencier en mémoire et plasmocyte que si il reçoit un signal contact dépendant d'un LTh folliculaire qui lui aussi possède une spécificité sur l'antigène présenté, il s'agit de la réponse thymo-dépendante. En d'autres termes, si un LB reconnaît un peptide endogène, il lui faut un LTh spécifique du peptide pour s'activer. Une activation des LB sans la coopération d'un LTh existe, la réponse thymo-indépendante provient généralement de la reconnaissance de motifs osidiques répétés et représente une faible part de la réponse humorale. La reconnaissance de peptide exogène est donc théoriquement centrée sur la capacité des LTh à distinguer les peptides exogènes dangereux. C'est cette capacité à ne pas s'activer vis-à-vis des antigènes du soi ou d'antigènes environnementaux non pathogènes qui définit la tolérance immunitaire. On distingue différents types de régulation du système immunitaire pour une activation dans un bon contexte : la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

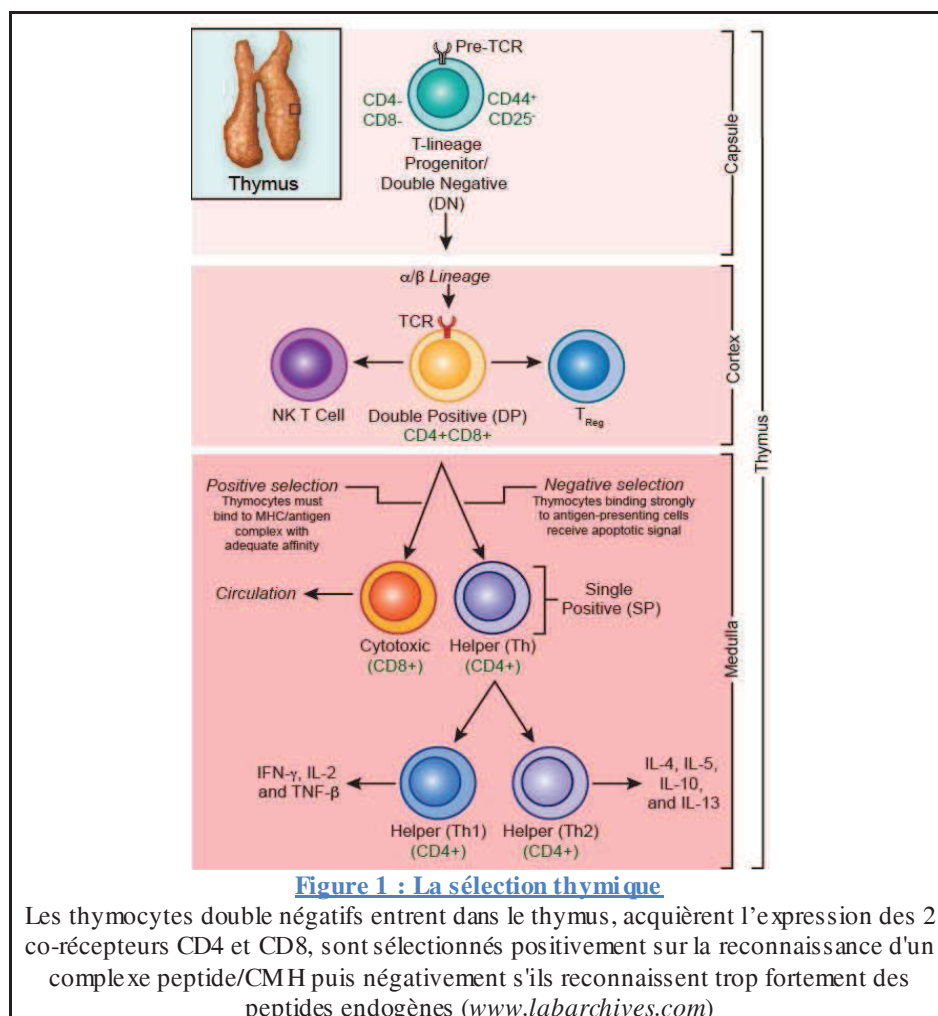
a. Tolérance centrale

La tolérance centrale est le mécanisme qui a lieu durant la maturation des LT qui permet la reconnaissance du « non soi » ou plutôt la non reconnaissance du « soi ». La thymopoïèse commence dans la moelle osseuse durant laquelle les précurseurs lymphoïdes subissent les premières étapes de leur maturation. Contrairement aux LB, les thymocytes ne

sortent pas de la moelle osseuse matures naïfs (près à être activés mais n'ayant jamais fixé d'antigènes), les thymocytes doivent rejoindre le Thymus pour continuer leur maturation et devenir matures. Les étapes de maturation thymiques permettent l'acquisition des molécules co-réceptrices CD4 ou CD8 qui définiront l'avenir du LT en LTh CD4<sup>+</sup> ou LTc CD8<sup>+</sup>. Les thymocytes sortent de la moelle osseuse à un stade dit double négatif, c'est-à-dire n'exprimant ni le co-récepteurs CD4 ni le CD8. A ce stade, la cellule réarrange les chaînes de son TCR puis il rentre dans le thymus et expriment les 2 molécules co-réceptrices CD4 et CD8, ils sont dits double positifs. 9 thymocytes sur 10 subissent un réarrangement de gènes du TCR improductif, c'est-à-dire que le nouveau gène est inexprimable et la synthèse d'un TCR impossible, les thymocytes ne reçoivent pas de signal de survie et meurent par « négligence ». Pour les autres cellules exprimant un TCR, cette double expression CD4 CD8 permet le test du récepteur sur les cellules corticales et médullaires du thymus qui expriment les CMH de classe I et II. La liaison du TCR à un complexe CMH de classe I sélectionnera le co-récepteur CD8 et régulera positivement le facteur de transcription Runx3 (*runt-related transcription factor 3*) qui initie le programme génétique de fonction cytotoxique (Park et al. 2010) alors que la fixation du TCR à un complexe CMH de classe II définira le thymocyte comme un futur CD4<sup>+</sup> LTh en activant l'expression du facteur de transcription ThPOK (*T helper-inducing POZ/Krüppel factor*) qui établit le programme génétique de type *helper* (He, Park, and Kappes 2010). Ce mécanisme permet donc de sélectionner les thymocytes ayant un TCR qui peut se fixer sur un complexe CMH. Les autres thymocytes, ne pouvant fixer un complexe, entreront en apoptose, il s'agit de la sélection positive. Les thymocytes vont perdre l'expression du co-récepteur non stimulé et deviendront simples positifs CD4 ou CD8.

La deuxième étape de sélection thymique permet ensuite d'éliminer les Thymocytes qui ont un TCR qui reconnaît avec trop d'affinité les peptides endogènes (du « soi »). La clé de ce mécanisme réside dans une caractéristique très importante des cellules médullaires du

thymus. En effet, elles expriment une enzyme *Autoimmune regulator* (AIRE) qui permet l'expression et l'apprêtement de quasiment tous les peptides endogènes codés par l'ADN dans les CMH de classe I et II. Lorsqu'un LT a passé la sélection positive, il doit tester son affinité sur les complexes CMH/peptide endogène. Si son affinité est trop forte, il est considéré comme auto-réactif et capable de s'activer contre son organisme, il entrera en apoptose. Il s'agit de la sélection négative, étape primordiale à l'élimination des LT auto-réactifs (Figure 1) Seuls les thymocytes n'ayant pas une affinité trop forte pour des complexes CMH/peptide endogène seront conservés et redistribués dans la circulation générale. La tolérance centrale n'est pas efficace à 100% et des lymphocytes auto-réactifs se retrouvent dans le sang périphérique. Ainsi, d'autres mécanismes périphériques existent pour prévenir l'activation lymphocytaire contre des éléments du soi.



Les Lymphocytes B subissent aussi des étapes de sélections durant leur maturation qui permet d'éliminer une partie des lymphocytes auto-réactifs. Le BCR des LB est produit sur le réarrangement aléatoire des gènes qui le compose avec une diversité combinatoire supérieur à  $10^{10}$ . La capacité à former des BCR auto-réactif est grande et le mécanisme de sélection dans la moelle osseuse élimine 90% des LB formé avant d'être libéré dans la circulation sanguine. Différents mécanismes ont été démontrés et explique cette sélection. Il s'agit de la délétion clonale, de l'anergie et enfin de l'immuno-editing.

Des mécanismes de délétion spécifiques d'auto-antigènes ont été mis en évidence dans les travaux de Nemazee (Nemazee and Buerki 1989) indiquant que des LB spécifiques de l'antigène H-2Kk étaient supprimées de la rate et des ganglions des souris qui expriment cet antigène  $\mu$ . Ces travaux ont suggérés que cette étape de délétion clonale avait lieu au stade de passage de l'état de pré-B à LB transitionnel.

Le mécanisme d'anergie des LB a été mis en évidence dans les travaux de 1988 (Goodnow et al. 1988) mettant en évidence un blocage de la maturation de LB spécifiques d'un antigène dans la moelle osseuse qui n'est pas une délétion clonale. Ces LB étaient caractérisés par une faible expression de leur IgM de surface contrairement à une forte expression des IgD mettant ainsi en évidence un rôle de cette chaîne lourde dans les mécanismes de tolérance centrale chez les LB

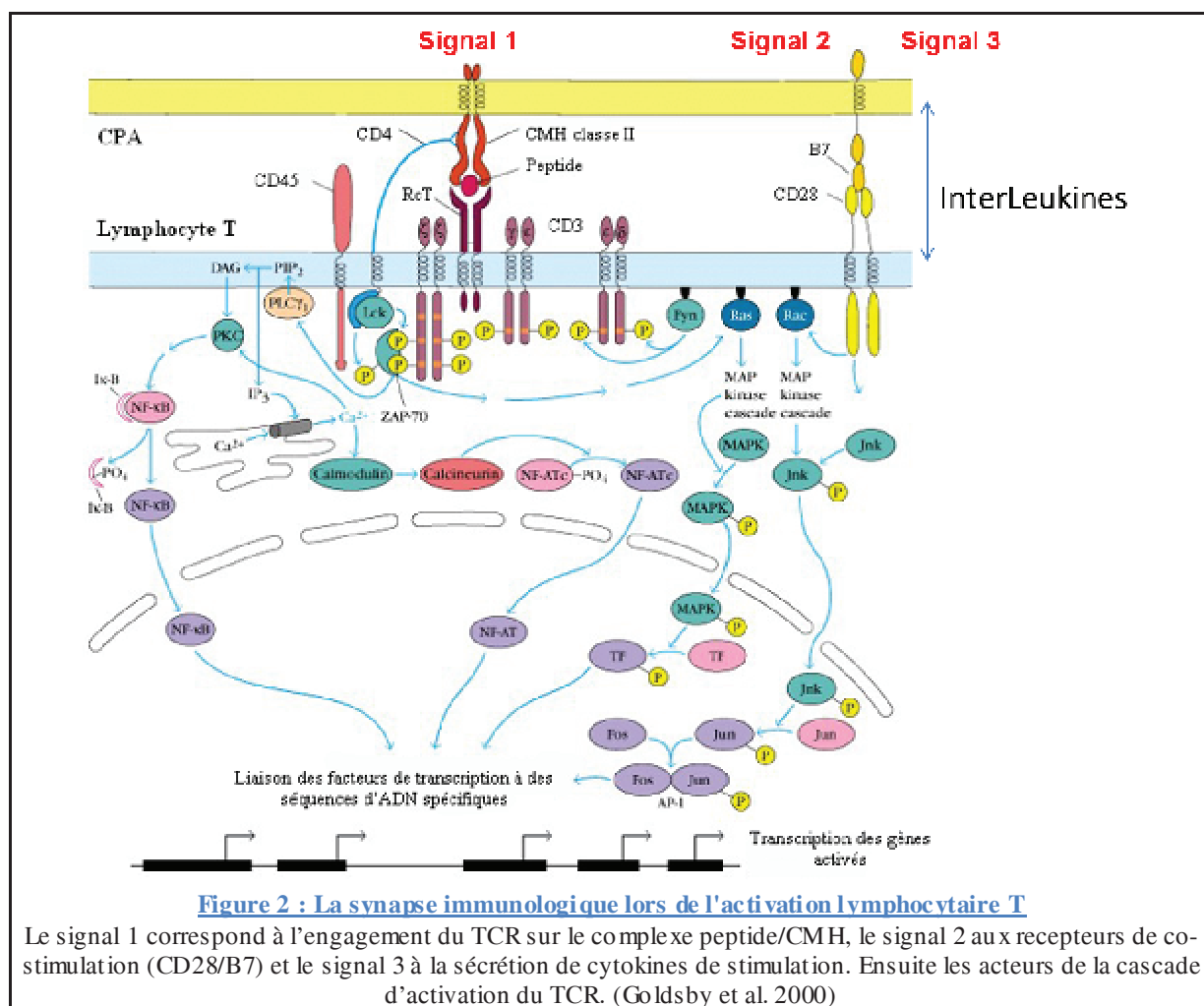
Enfin, il a été montré que, même dans un système d'expression de chaînes de BCR auto-réactives, certains LB continuaient leur maturation par un phénomène « d'editing ». C'est-à-dire que le LB auto-réactif modifie son BCR et réorganise la synthèse d'une nouvelle chaîne légère pour modifier la spécificité de son récepteur pour continuer sa maturation (Tiegs, Russell, and Nemazee 1993; Gay et al. 1993; Pelandra et al. 1997).

## b. Tolérance périphérique

Pour introduire le mécanisme de la tolérance périphérique il est important de revenir sur les mécanismes moléculaires d'activation lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>. L'activation de ces cellules est dépendante de l'engagement du TCR sur un complexe peptide/CMH de classe II d'une CPA, il s'agit du signal 1 d'activation. Cet engagement entraîne l'activation de Lck (*lymphocyte cell-specific tyrosine kinase*) qui phosphoryle alors les motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) du complexe CD3, entraînant le recrutement de ZAP70 (*TcR- $\zeta$  chain-associated 70 kDa tyrosine phosphoprotein*), qui mène à une cascade de phosphorylation. La protéine transmembranaire LAT (*linker of activation in T cells*) est l'une des principales cibles de ZAP70 ; elle permet l'activation de PLC $\gamma$ 1 qui hydrolysera le lipide membranaire PIP2 (*phosphatidyl inositol diphosphate*) en DAG (*diacylglycerol*) et IP3 (*inositol triphosphate*), ayant chacun une fonction dans l'activation cellulaire. Le DAG active 2 voies de signalisation majeures que sont i) les MAPK (*mitogen-associated protein kinase*) qui conduisent à l'activation du complexe AP-1 (*adaptor protein complex 1*) formé par le couple Fos/Jun, et ii) PKC $\theta$ , qui permet l'activation de facteurs de la famille NF- $\kappa$ B. IP3 active de son côté les canaux calciques du réticulum endoplasmique, entraînant un flux intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> dont il résulte l'activation du facteur de transcription NFAT1 (*nuclear factor of activated T cells*). L'action conjuguée d'AP-1 et de NFAT1 a pour finalité la transcription du gène de l'IL-2 (Smith-Garvin et al., 2009) et l'activation lymphocytaire T.

Les molécules de co-stimulation (signal 2) permettent une transduction complète du signal 1. La fixation de CD28 avec ses ligands CD80 ou CD86 (complexe appelé B7), exprimés par les CPA, engendre le recrutement de la sous-unité p85 de PI3K. Cette dernière effectue la conversion de PIP2 membranaire en PIP3, qui va cibler Akt. Akt possède un rôle essentiel dans la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, qui permettent

l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl- $x_L$  (Smith-Garvin, Koretzky, and Jordan 2009) et active pleinement AP-1 ainsi que mTOR (Valdor and Macian 2013) (Figure 2).



### i. L'anergie

L'engagement du TCR en absence de co-stimulation par l'axe B7/CD28 active inefficacement les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt. Il en résulte une activité réduite de NF- $\kappa$ B et l'absence de transactivation de CD28RE (*CD28 response element*) sur le promoteur du gène de l'IL-2 *via* des flux calciques de faibles intensités (Wells 2009). Alors que les faibles concentrations de Ca $^{2+}$  ne permettent pas d'activer efficacement NF- $\kappa$ B et le complexe AP-1, l'activation ainsi que la translocation nucléaire de NFAT1 s'effectuent sans défaut. En l'absence d'AP-1, NFAT1 induit l'expression de gènes répresseurs transcriptionnels, tels que Egr2 et Egr3 (*early growth response*), ou *Ikaros* codant Ikaros

(Borde et al. 2006). Ces trois gènes sont des inhibiteurs de la transcription d'IL-2. L'inactivation conjuguée des gènes Egr2 et Egr3 entraîne une auto-immunité, tandis que leur surexpression active fortement l'ubiquitine-ligase E3 Cbl-b. Par ailleurs, Egr-2 et Egr-3 stimulent l'expression des suppresseurs de signaux cytokiniques SOCS1 et SOCS3, qui inhibent notamment STAT1 et STAT3 (Li et al., 2012). Il en résulte un état de non activation de ces lymphocytes qui ne pourront plus s'activer, même après re-stimulation avec les co-récepteurs B7. Les lymphocytes sont dits anergiques.

Il est à noter qu'en l'absence de contexte inflammatoire, les CPA, notamment les cellules dendritiques résidentes des ganglions lymphatiques ou de la rate, induisent un état de tolérance chez les lymphocytes T naïfs fortement avides pour les complexes CMH/peptide du soi après avoir passé les étapes de sélection thymique. Ces CPA tolérogènes, exprimant des complexes CMH/peptide du soi, induisent chez les lymphocytes T l'expression de molécules immuno-régulatrices telles que CTLA-4 et PD-1. CTLA-4 est nécessaire pour stopper le cycle cellulaire, tandis que PD-1 maintient la cellule dans un état de paralysie fonctionnelle, en inhibant notamment la stabilité des interactions avec les CPA (Mueller 2010). CTLA-4 est une molécule membranaire ayant comme ligand le complexe B7 avec une plus grande affinité que le CD28. Lorsque CTLA-4 est exprimé, il entre en compétition avec le CD28 sur la fixation de B7 et empêche ainsi la transduction du signal 2 par cet axe. Classiquement CTLA-4 est exprimé par les LTh après une forte activation pour mettre en place la fin de la réponse immunitaire : il s'agit de la contraction clonale. Mais CTLA-4 peut aussi être exprimé dans d'autres contextes pour empêcher une activation fortuite. PD1 est aussi une molécule membranaire des LT et a comme ligand PDL-1 et PDL-2. Son expression est induite par les signalisations du TCR, et de la chaîne  $\gamma$  commune des récepteurs aux interleukines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 chez les lymphocytes. Pendant la signalisation induite par le TCR, l'engagement de PD-1 avec l'un de ses ligands permet de bloquer la prolifération cellulaire

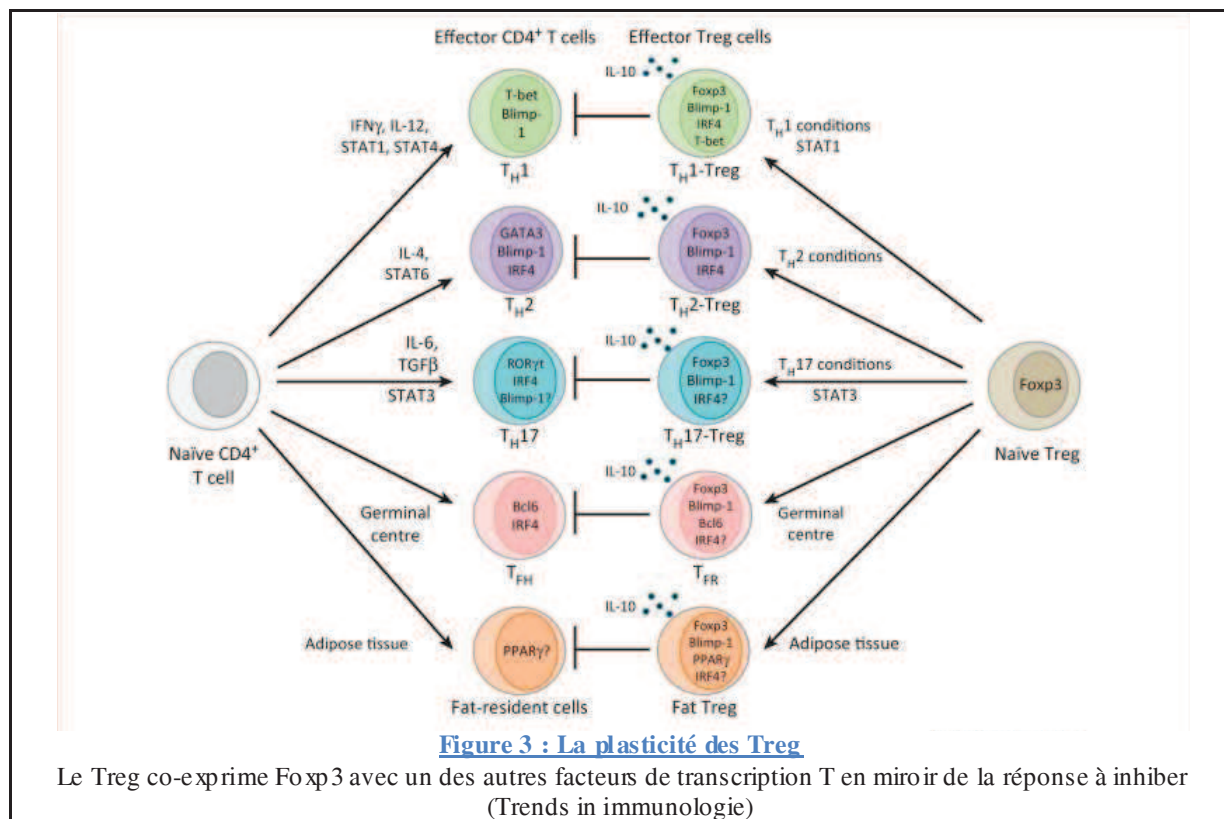
mais surtout d'inhiber la production de cytokines ainsi que les fonctions cytotoxiques, et réduit la survie cellulaire du lymphocyte en inhibant la voie PI3K/Akt (Keir et al. 2008). PD-1 influe aussi en déstabilisant la synapse immunologique entre lymphocytes et cellules présentatrices d'antigènes et en augmentant le seuil d'activation lymphocytaire (Kahan, Wherry, and Zajac 2015), ce qui inhibe l'activation T. D'autres acteurs sont importants pour le maintien de l'intégrité organique et le contrôle d'une activation aberrante du système immunitaire. Nous ne présenterons dans ces travaux que les lymphocytes T et B régulateurs.

## ii. Les Treg

Les lymphocytes T régulateurs (Treg), ont été mises en évidence comme permettant de prévenir l'auto-immunité chez la souris (Sakaguchi et al. 1995). Il s'agit d'une population de lymphocytes T  $CD4^+CD25^+$  ou  $CD4^+CD45RB^-$  représentant de 1 à 10% des lymphocytes T  $CD4^+$  totaux chez l'homme et la souris. Les Treg contrôlent l'activité périphérique des lymphocytes effecteurs en exerçant une activité suppressive sur les réponses excessives ou aberrantes. Ils migrent dans les sites inflammatoires et inhibent les différentes populations lymphocytaires T  $CD4^+$  (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et Thelper folliculaire), LT  $CD8^+$  cytotoxiques et LB. La première caractérisation moléculaire de ces cellules est intervenue avec la découverte de l'expression par les Treg du facteur de transcription Foxp3. Les Treg sont dépendants de l'IL-2 pour leur survie, leur prolifération, le maintien de l'expression de Foxp3 et de leur fonction suppressive. Après acquisition du phénotype effecteur, les Treg peuvent exercer une activité suppressive par le biais de nombreux mécanismes. Ils peuvent sécréter in vivo des cytokines immuno-régulatrices telle que l'IL-10, dont l'effet le plus notable est l'inhibition de l'expression du CMH II et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 par les cellules présentatrices d'antigènes (Shalev et al. 2011). Les Treg produisent également l'IL-35 ou le *Tumor growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), et ont la capacité d'activer ce dernier depuis sa forme latente par le biais de leur forte expression de l'intégrine  $\alpha V\beta 8$



(Worthington et al. 2015). Étant dépendant d'une source d'IL-2 exogènes, les Treg nécessitent de se localiser dans une zone d'activation immunitaire pour exercer leurs fonctions répressives et ont la capacité de se polariser sur la réponse en cours pour l'inhiber (Figure 3).

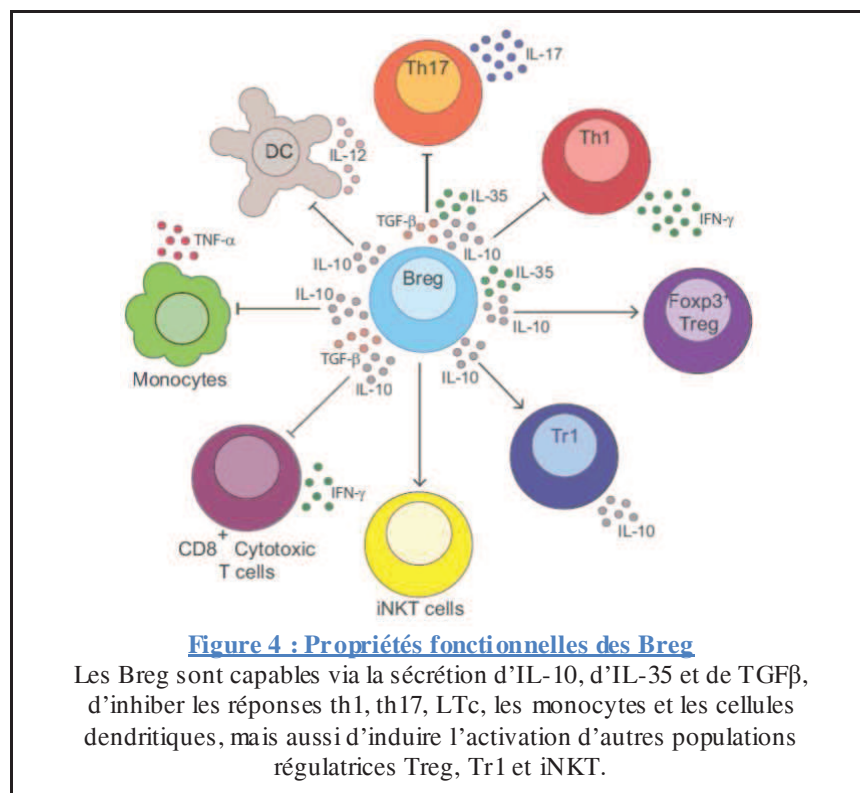


Il existe 2 sources de Treg, La majorité des Treg circulant sont issus directement de la sélection thymique, ils sont dits Treg naturels (nTreg) contrairement aux Treg induits (iTreg) qui sont issus d'un LTh conventionnel CD4<sup>+</sup> Th0 naïf Foxp3<sup>-</sup> qui, suite à des stimulations cytokiniques particulière comme la sécrétion d'IL-6 et de TGF- $\beta$  dans des microenvironnements toléro-gènes, se polarise en iTreg et prend un phénotype régulateur.

### iii. Les Breg

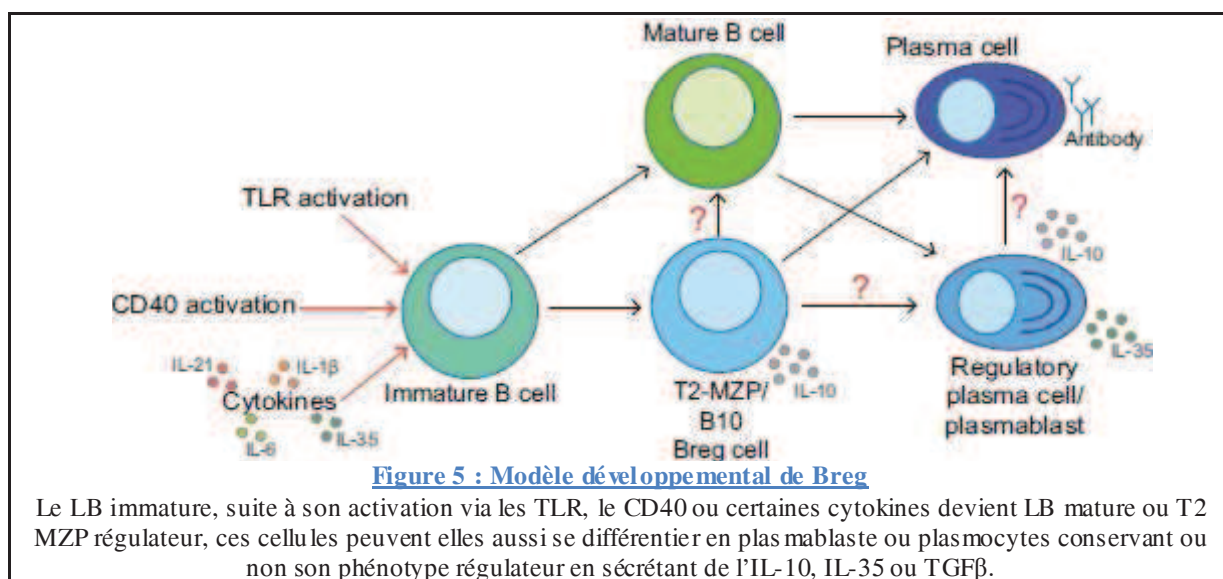
C'est en 1974 que les premières études ont démontré un rôle suppresseur ou régulateur de la population B. En effet, la déplétion des LB spléniques provoque le développement d'une hypersensibilité chez le porc de guinée (Katz, Parker, and Turk 1974). En 1996, des modèles de souris déficientes en LB sont dans l'incapacité de réduire l'inflammation d'une encéphalite

induite suggérant ainsi ce rôle immuno-régulateur de la population B (Janeway, Goodnow, and Medzhitov 1996). Ce n'est qu'en 2002 qu'un premier mécanisme régulateur a été mis en évidence : les LB suppriment l'inflammation par la sécrétion d'IL-10 (Fillatreau et al. 2002). Depuis, d'autres mécanismes régulateurs ont été mis en évidence comme l'inhibition de l'orientation inflammatoire Th1 et Th17 par les LB régulateurs dits Breg (Carter et al. 2011) et le maintien voire l'induction de Treg (Sun et al. 2008). Les Breg sont aussi capable d'inhiber une réponse inflammatoire en contrôlant les phénotypes des cellules dendritiques qui diminuent de fait la sécrétion d'interleukines pro-inflammatoires et inhibent les orientations Th1 et Th17 (Matsumoto et al. 2014). Plus récemment, il a été montré que les Breg ont la capacité de sécréter les interleukines anti-inflammatoires IL-35 et TGF- $\beta$ . La stimulation de LB par de l'IL-35 *in vitro* induit une boucle autocrine positive, les LB sécrètent à leur tour de grandes quantités d'IL-35 et ont des fonctions régulatrices en transfert adoptifs (Wang et al. 2014) (Figure 4).



Plusieurs populations de LB avec des phénotypes proches et des fonctions régulatrices ont été décrites mais ces différences sont-elles le signe de l'existence de plusieurs sous populations distinctes de Breg ou s'agit-il de la même population répondant différemment en fonction de l'environnement immunitaire tissulaire ? Cette question reste à résoudre. Pour le moment, les populations B identifiées comme capables de sécréter des interleukines régulatrices sont les LB précurseurs transitionnels 2 de la zone marginales (T2-MZP) (Evans et al. 2007), les LB CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup> dits B10 (Yanaba et al. 2008; Yoshizaki et al. 2012), les LB de la zone marginale des organes lymphoïdes (Gray et al. 2007), les LB exprimant Tim1 (Ding et al. 2011), les plasmocytes CD138<sup>+</sup> (Neves et al. 2010; Shen et al. 2014), et les plasmablastes (Matsumoto et al. 2014). Chez l'humain, différents travaux ont permis de caractériser certains Breg et 2 phénotypes font consensus pour le moment : CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>CD1d<sup>hi</sup> (Blair et al. 2010; Flores-Borja et al. 2013) et CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> (Iwata et al. 2011). Ces difficultés à caractériser phénotypiquement les Breg ou seulement sur leur capacité à sécréter de l'IL-10 a fait se poser la question de l'existence d'un facteur de transcription commun aux différentes sous populations B régulatrices, comme Foxp3 pour les Treg. L'identification d'une telle molécule facilitera leur analyse phénotypique et permettra de répondre à la question de leur ontogénie. Aujourd'hui, 2 modèles de développement existent : le premier correspond à l'existence d'une population B spécifique, un peu comme les nTreg, qui nécessitent l'expression d'un facteur de transcription pour acquérir un phénotype régulateur. La deuxième hypothèse propose que quel que soit le stade de développement classique d'un LB, s'il reçoit certains stimuli, il peut acquérir ce phénotype régulateur. L'incapacité de certaines études à identifier un facteur de transcription commun ainsi que l'hétérogénéité phénotypique des Breg nous fait pencher vers cette dernière hypothèse (Bouaziz et al. 2010; Lin et al. 2014). En effet, les LB à tous les stades de

développement sont capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires en fonction de l'environnement (Figure 5).



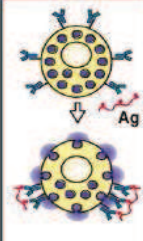
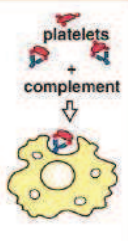
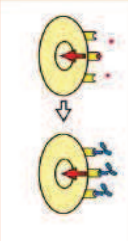
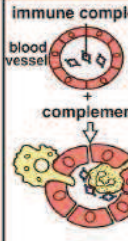



La question est posée de savoir quels sont les stimuli qui permettent cette transition régulatrices des LB. Plusieurs études ont démontré que l'induction des Breg était très forte en contexte inflammatoire auto-immun (Evans et al. 2007; Colliou et al. 2013) et que l'absence de Breg ne permettait plus de contrôler ces contextes inflammatoires voire de les induire. La voie la plus décrite pour l'induction du phénotype régulateur B met en jeu l'engagement du BCR et la stimulation de TLR9 et/ou CD40 (Mauri and Bosma 2012). Il a été démontré récemment l'induction de Breg suite à la sécrétion des interleukines IL-1β et IL-6 dans un contexte de polyarthrite auto-immune (Rosser et al. 2014). D'autres cytokines peuvent induire des Breg comme l'IL-21 (Yoshizaki et al. 2012) ou le facteur de croissance des granulocytes GM-CSF en association avec l'IL-15 (Rafei et al. 2009). Une étude a démontré que l'absence de cytokine anti-inflammatoire pouvait induire des Breg. En effet, il a été rapporté que l'utilisation d'un anti-IL-35 induisait l'apparition d'une population B sécrétrice d'IL-10 et d'IL-35 (Wang et al. 2014). Ces éléments indiquent que les cytokines anti-inflammatoires sont aussi importantes dans l'induction et le développement des Breg. Les différentes pressions homéostatiques serait à l'origine du développement ou de l'inhibition du

compartiment B régulateurs (Chasset et al. 2016; de Masson et al. 2015; Lykken, Candando, and Tedder 2015)

### 3. Introduction à la rupture de tolérance

L'auto-immunité est physiologique, puisqu'une partie plus ou moins importante des lymphocytes présentent des récepteurs à l'antigène avec une faible affinité pour des éléments du soi et de façon polyclonale, mais le système de régulation de cette auto-immunité peut être défaillant. Apparaît alors une auto-immunité pathologique, auto-agressive et plus ou moins ciblée, qui va aboutir au déclenchement d'une maladie auto-immune (MAI). Après cette vision rapide des différents éléments permettant l'activation et la régulation du système immunitaire, présentons maintenant les situations pathologiques dans lesquels le système immunitaire s'active contre des antigènes normalement tolérés. Ces situations pathologiques peuvent toucher des antigènes exogènes normalement tolérés, on parlera dans ce contexte d'allergies et si l'antigène normalement toléré est endogène, on parlera alors d'auto-immunité.

L'allergie est donc un terme général décrivant toutes les pathologies associées à l'activation du système immunitaire contre un élément, un antigène exogène présent normalement dans l'environnement. Les intolérances ne sont pas des allergies car le système immunitaire ne s'active pas contre un antigène mais le mécanisme est shunté. Dès 1945, Gell et Coombs décrivent une classification aujourd'hui reprise et améliorée mais qui englobe la majorité des mécanismes physiopathologiques d'hypersensibilité, c'est-à-dire les allergies et les auto-immunités (Figure 6).

| Type I   | Type II  |   | Type III   | Type IV  |   |  |
|--|--|---|--|--|---|--|
| IgE  | IgG  |   | IgG  | T <sub>H</sub> 1 cells   | T <sub>H</sub> 2 cells  | CTL  |
| Soluble antigen  | Cell- or matrix-associated antigen   | Cell-surface receptor   | Soluble antigen  | Soluble antigen  | Soluble antigen   | Cell-associated antigen  |
| Mast-cell activation   | Complement, FcR <sup>+</sup> cells (phagocytes, NK cells)  | Antibody alters signaling   | Complement, Phagocytes   | Macrophage activation  | IgE production, Eosinophil activation, Mastocytosis   | Cytotoxicity   |
|   |   |      |   |   |    |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>* Rhinite allergique</li> <li>* Asthme</li> <li>* Choc anaph.</li> <li>* Anaphylaxie</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>* Cytopénies médic.</li> <li>* Réaction transfus.</li> <li>* Anémie</li> <li>* Hémolytique autoim</li> <li>* Pemphigus</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>* Thyroïdite</li> <li>* Myasthénie.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>* Réaction d'Arthus</li> <li>* Maladie sérique</li> <li>* Lupus érythémateux</li> <li>* Vasculites immuno.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>* IDR tuberculine</li> <li>* Rejet de greffes</li> <li>* Arthrite, Diabète,</li> <li>* Psoriasis</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>* Asthme chronique</li> <li>* Rhinite chronique</li> <li>* Dermatite atopique</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>* Dermatite de contact</li> <li>* Rejet de greffes</li> <li>* Diabète type I</li> </ul> |

**Figure 6 : Les différents types d'hypersensibilités**

Cette classification, issue de celle de Gell et Coombs, prend en compte les allergies et les auto-immunités et ne considère que le mécanisme physiopathologique cellulaire.

Très brièvement, l'allergie de type 1 est la forme clinique la plus commune, le déclenchement de sa symptomatologie est immédiat lors de la rencontre avec un antigène (après la première phase de sensibilisation). Lors de la sensibilisation, l'antigène exogène est présenté à un L<sub>T</sub> qui activera un L<sub>B</sub> pour sécréter des IgE qui vont se fixer sur les mastocytes en attendant la rencontre avec l'antigène. Lors de la réintroduction de l'antigène, les anticorps fixés sur les mastocytes vont ponter et provoquer la dégranulation mastocytaire qui va libérer de l'histamine responsable de la clinique. Ce sont les rhinites aux pollens, aux poils d'animaux, l'asthme ou bien les chocs anaphylactiques.

L'allergie de type 2 est aussi le fruit de la collaboration L<sub>T</sub>/L<sub>B</sub> mais provoque la sécrétion d'anticorps d'isotype IgG. Ces anticorps vont recruter d'autres acteurs de l'immunité après leur fixation sur l'antigène comme le complément ou les polynucléaires.

L'allergie de type 3 est aussi liée à la présence d'IgG mais dans ce cas la fixation des anticorps à l'antigène cible provoque la formation de complexes immuns qui sont la source de la symptomatologie. Il est rapporté des vascularites ou des insuffisances rénales liées au dépôt de ces complexes dans le système circulatoire ou dans les glomérules rénaux.

L'allergie de type 4 est dite retardée, c'est-à-dire que sont classées toutes les pathologies associées à l'activation immunitaire plusieurs jours ou semaines après l'exposition à l'antigène. Certaines réactions médicamenteuses ou l'allergie au nickel sont de ce type, il est aussi rapporté un lien avec des prédispositions génétiques (essentiellement variants HLA) et la réactivation d'agents infectieux notamment viraux. Le délai d'apparition des signes cliniques est lié au recrutement et à la prolifération des acteurs de cette pathologie (mastocytes, polynucléaires, LTc,...).

Cette classification mécanistique peut prendre en compte les maladies auto-immunes car les physiopathologies sont proches sauf que ce sont des antigènes endogènes qui sont les cibles immunologiques.

## B. Les Maladies auto-immunes

### 1. Introduction

Les maladies auto-immunes sont donc liées à l'activation du système immunitaire contre des éléments du « soi ». Elles sont classées en 2 grandes catégories : les maladies spécifiques d'organes ou de tissus et les maladies non spécifiques d'organes ou systémiques. Une classification mécanistique comme les hypersensibilités est aussi possible, comme vu précédemment ; une autre classification existe aussi et décrit 2 types de MAI, les MAI à auto-anticorps et les MAI inflammatoires. Dans tous les cas, elles sont décrites comme multifactorielles, c'est-à-dire mettant en jeu dans leur déclenchement et leur développement des éléments propres à l'individu (facteurs génétiques, endocriniens,...) et des facteurs environnementaux (infectieux, agents chimiques,...). La prévalence globale (même si certaines sont assez rares) est élevée et en font donc un problème de santé publique majeur car ce sont des maladies chroniques au traitement long et coûteux.

L'épidémiologie de ce groupe de maladie reste difficile à établir tant par la difficulté diagnostique de certaines d'entre elles que par l'hétérogénéité des formes cliniques qui fausse le classement. Au total, l'augmentation du nombre de diagnostics, l'allongement de la durée de vie, l'amélioration de la prise en charge diminuant la mortalité, la prévalence de ce groupe entier de maladie est estimée entre 5 et 10%. Les pathologies thyroïdiennes et le diabète de type 1 sont les pathologies les plus représentées avec des prévalences proches de 4000 pour  $10^5$  habitants. La prévalence de la maladie cœliaque semble avoir été largement sous-estimée puisque des études récentes ramènent le chiffre de 100 pour 100 000 habitants à quasiment 1/200 pour les formes frustres. De façon générale, les maladies auto-immunes s'observent chez la femme avec des sexes ratio qui peuvent aller jusqu'à 9/1 pour le lupus érythémateux systémique ou le syndrome de Gougerot Sjögren. Les MAI s'observent à tout âge mais la femme est surtout touchée en période d'activité ovarienne avant la ménopause. Les hormones sexuelles chez la femme ont un rôle dans le développement de ces maladies, en effet, des modèles animaux confirment cette hypothèse et il est affirmé un lien entre MAI et contraception hormonale, grossesse et ménopause.

Des facteurs génétiques ont été mis en évidence notamment devant la concordance de ces maladies chez des jumeaux monozygotes (25 et 30% pour le lupus et le diabète de type 1 respectivement) ou des formes familiales, cependant la concordance n'est pas entière ce qui suggère un rôle prépondérant des éléments environnementaux. La recherche de facteurs associés au MAI a orienté vers la mise en évidence de variants ou d'isoformes de molécules HLA particulières, certains allèles HLA DR1 et DRB1 sont associés à la polyarthrite rhumatoïde (PR), certains allèles DQB1 sont des facteurs de susceptibilité au diabète de type 1. Pour les facteurs environnementaux, l'implication d'agents infectieux dans le déclenchement des MAI est suggérée par de nombreux arguments comme la similitude de structures moléculaires entre des auto-antigènes et des molécules microbiennes. Par exemple,



il y a des similitudes entre la protéine M du streptocoque et l'endocarde expliquant certaines symptomatologies d'atteintes cardiaques auto-immunes lors d'infection à Streptocoque. L'établissement d'un lien aussi direct entre auto-immunité et infection est rare, cependant certains éléments laisse penser que des infections peuvent jouer dans le déclenchement de certaines MAI comme certaines infections virales qui induiraient le diabète de type 1. Enfin certaines substances chimiques peuvent induire des MAI comme le chlorure de vinyle qui peut être impliqué dans la survenue d'acrosyndromes, ou encore les ultraviolets impliqués dans l'émergence du lupus érythémateux.

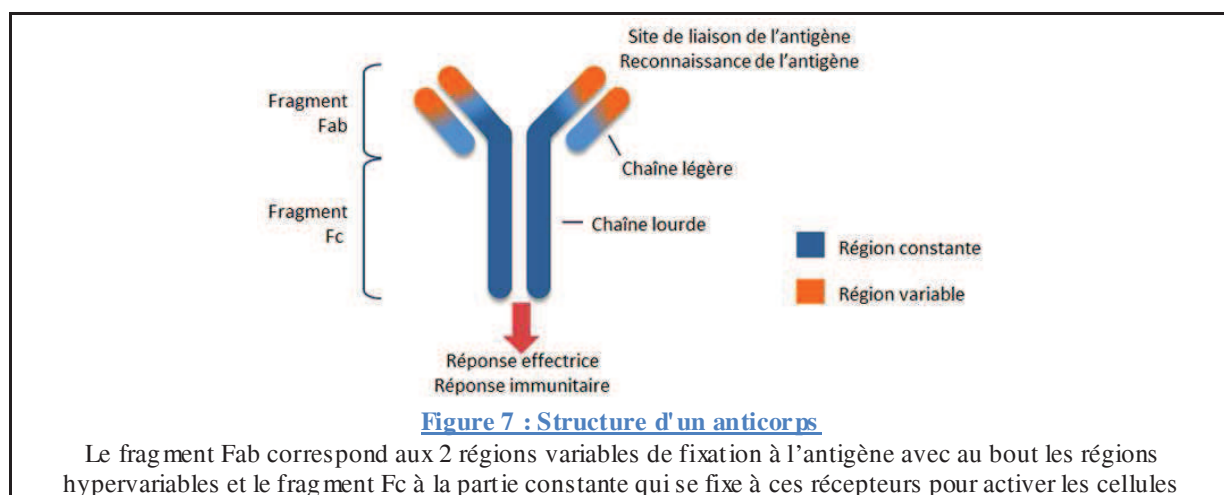
## 2. Acteurs de l'auto-immunité

Différentes composantes du système immunitaire peuvent être responsables de la symptomatique auto-immune. Tous les mécanismes en jeu lors des réponses immunes normales peuvent être dirigés sur des antigènes, des tissus, des organes du soi.

### a. Auto-immunité humorale

Une des composantes classiques de l'auto-immunité est la sécrétion d'anticorps dirigés contre des éléments du soi.

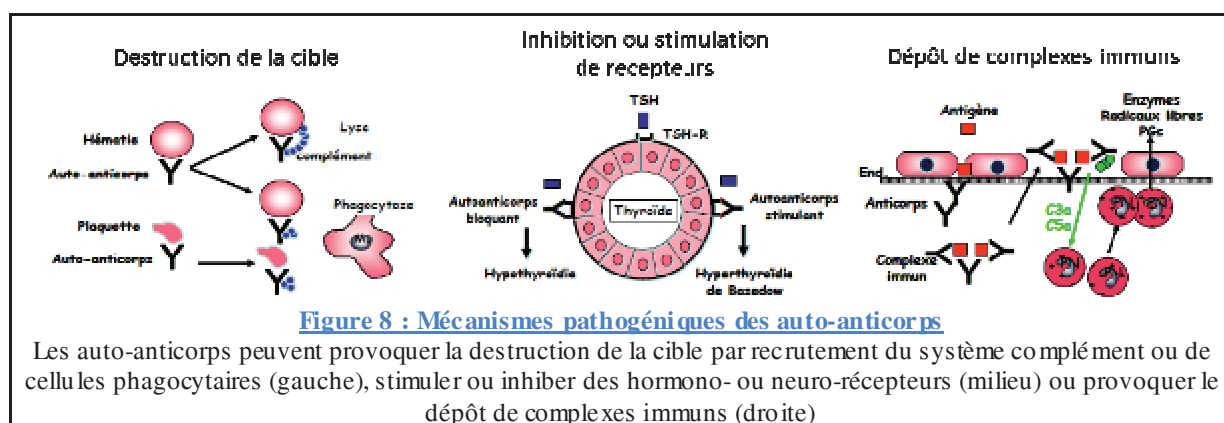
Les anticorps sont donc des protéines sécrétés par les plasmocytes après l'activation d'un LB et correspondent à la forme soluble du BCR du LB activé et différencié en plasmocyte. Les anticorps sont composés de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères associées entre elles pour former : d'un côté la partie qui fixe 2 antigènes symétriquement (Fab) et de l'autre coté la partie constante dit fragment cristallisable (Fc). La partie qui fixe l'antigène est appelée région hypervariable, cette région subit beaucoup de phénomènes de mutation et de maturation pour augmenter l'affinité de cette région pour son antigène lorsque le LB est sélectionné. Le fragment Fc correspond à l'isotype qui peut être soit IgM, IgG, IgA ou IgE. Ces différents isotype confèrent à l'anticorps des propriétés différentes pour l'activation du complément et n'active pas les mêmes récepteurs (FcR) (Figure 7).



La production des chaînes lourdes et légères des Ig est le fruit de la recombinaison aléatoire des gènes codant pour le BCR : VH, DH et JH et C pour la chaîne lourde et VL, JL et DL de la sous famille Kappa ou lambda pour la chaîne légère. Ils subissent ensuite d'autres étapes de maturation après la rencontre avec un antigène comme l'hypermutation somatique pour augmenter son affinité pour son antigène cible en créant des mutations sur les régions hypervariables des gènes des chaînes lourdes et légères ainsi que le *switch* isotypique.

La sécrétion massive d'anticorps nécessite une coopération T/B et une inter-spécificité sur le même antigène, c'est-à-dire que le LB qui secrètera des auto-anticorps à la même spécificité antigénique que le LTh qui doit l'activer. Donc pour sécréter des auto-anticorps, il faut que les 2 lymphocytes T et B soient auto-réactifs. Mécaniquement, le LB auto-réactif va recevoir un message d'activation du LT helper folliculaire permettant sa maturation, l'hypermutation somatique et la commutation de classe pour sécréter des auto-anticorps affins et « *switchés* ». Il est retrouvé des auto-anticorps dans toutes les MAI. Dans certains cas, les auto-anticorps sont directement responsables de la pathologie, dans d'autres cas la présence d'auto-anticorps signe l'existence de la maladie sans être la source de la physiopathologie. Les anticorps dirigés contre des éléments du soi peuvent avoir des effets physiologiques délétères par différents mécanismes, cela dépend de l'isotype de l'anticorps et de son affinité et cela dépend aussi de la cible, de son action physiologique et de sa localisation tissulaire.

Les anticorps d'isotype IgM, IgG1 et IgG3 ont la capacité de recruter le complément. Lorsqu'ils vont fixer un auto-antigène, le recrutement du complément va provoquer la destruction de la cible. L'opsonisation est un autre mécanisme pathologique direct, l'opsonisation d'un antigène va faciliter sa phagocytose par le système réticulo-endothélial et donc sa destruction. Si la cible est un récepteur hormonal ou à neuromédiateur, la fixation d'un auto-anticorps peut provoquer son inhibition ou sa sur-stimulation. Enfin, certains auto-anticorps ont la capacité de former des complexes immuns dont la pathogénie est indirecte, les complexes se déposent dans le système circulatoire et/ou rénal et provoquent des dégâts tissulaires (Figure 8).



### b. Auto-immunité cellulaire

Lorsque les auto-anticorps ne sont pas impliqués dans la physiopathologie de la MAI, ils en sont la conséquence. L'auto-immunité cellulaire n'exclut pas la sécrétion d'auto-anticorps mais le mécanisme physiopathologique passe par le recrutement d'acteurs cellulaires cytotoxiques capables d'induire un environnement inflammatoire. Ces acteurs sont les LTc qui reconnaissent un auto-antigène et lysent les cellules qui le présentent dans leur CMH de classe I (une forme de diabète insulino-dépendant). Les LTh sont aussi largement impliqués dans certaines pathologies auto-immunes à orientation Th17 comme la PR par exemple : les acteurs recrutés sont cellulaires et les dégâts articulaires observés sont liés aux signaux d'inflammation reçus par les ostéoblastes. Il y a aussi un recrutement des acteurs

innés dans des pathologies dites auto-inflammatoires comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et Rectocolite hémorragique) dans lesquelles un lien avec une activation des TLR et des NLR peut être en cause. Ces maladies auto-inflammatoires font débat sur leur appartenance au groupe des maladies auto-immunes de par la difficulté à mettre en évidence un mécanisme pathologique immunitaire précis.

### 3. Maladies auto-immunes spécifiques d'organes

Il est identifié comme maladie auto-immune spécifique d'organe les pathologies immunitaires dans lesquelles l'antigène reconnu n'est exprimé que par un organe ou un tissu particulier. La symptomatologie sera purement liée à l'atteinte tissulaire spécifique de la maladie et au mécanisme d'action pathologique sur la cible. Cependant, il a été montré au cours de l'évolution clinique des MAI spécifiques d'organes, des phénomènes de chevauchement avec l'association de plusieurs syndromes auto-immuns spécifiques d'organes ou systémiques, probablement dus à l'existence d'un terrain propice au développement de l'auto-immunité. Ces remarques remettent en cause les classifications précédentes sur les acteurs de l'auto-immunité qui ne sont en fait pas exclusif d'un type de réponse, ou bien encore la cible de l'auto-immunité qui évolue au cours des maladies. Cependant, la physiopathologie majeure des maladies auto-immunes spécifiques d'organes reste liée à la sécrétion d'auto-anticorps spécifiques d'une cible, source de la symptomatologie. Elles représentent aussi le groupe de maladies auto-immunes avec la plus forte incidence comme les thyroïdites. Les principales MAI spécifiques d'organes sont présentées dans le tableau 1 ci-après :

**Tableau 1 : Exemples de maladies auto-immunes spécifiques d'organes**

| Organe         | Maladie                     | Molécule cible                                      | anticorps                | référence             |
|----------------|-----------------------------|---|--------------------------|-----------------------|
| Thyroïde       | Thyroïdite Hashimoto        | Thyroperoxydase                                     | Anti-TPO                 | Khan FA et al 2015    |
|                | Maladie de Basedow          | Récepteur à la TSH                                  | Anti-TSH-R               |                       |
| Foie           | Cirrhose biliaire primitive | Pyruvate deshydrogenase mitochondriale              | Anti-mitochondrie type 2 | Ivernizzi P 2013      |
|                | Hépatite AI type 1          | Actine F  | Anti-actine              |                       |
|                | Hépatite AI type 2          | Cytochrome P450                                     | Anti-LMK1                |                       |
| Muscle         | Myasthénie                  | Récepteur à l'acétylcholine                         | Anti-AchoR               | Ha JC et al 2014      |
| Intestin       | Maladie cœliaque            | Transglutaminase tissulaire                         | Anti-TG                  | Elli L et al 2015     |
| Pancréas       | Diabète type 1              | Insuline  | Anti-insuline            | Taplin CE et al 2008  |
|                |                             | Glutamic acid decarboxylase                         | Anti-GAD                 |                       |
|                |                             | Protein tyrosine phosphatase                        | Anti-IA2                 |                       |
| Estomac        | Maladie de Biermer          | Pompes NA/K pariétales                              | Anti-muqueuse gastrique  | Park JY et al 2013    |
|                |                             | Facteur intrinsèque                                 | Anti-FI                  |                       |
| Peau           | Pemphigus                   | Desmoglénines 1 et 3                                | Anti-Dsg1 –Dsg3          | Atzmony L et al 2014  |
|                | Pemphigoïde bulleuse        | BP180 BP230   | Anti-BP180 –BP230        | Kneisel A et al 2014  |
| Rein et poumon | Maladie de Goodpasture      | Collagène type 4 de la membrane basale glomérulaire | Anti-MBG                 | Hellmark T et al 2014 |

#### 4. Maladies auto-immunes non spécifiques d'organes

Les maladies auto-immunes non spécifiques d'organes ou systémiques sont relativement rares par rapport aux autres MAI sauf pour la PR. Les mécanismes auto-immuns sont en général multiples ; les auto-anticorps présents ne sont pas toujours pathogéniques et sont des conséquences du dérèglement immunitaire. Il n'y a donc pas toujours de cible antigénique particulière et les mécanismes auto-immuns sont à la fois humoraux et cellulaires. Les principales MAI systémiques sont décrites dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 2 : Exemples de maladies auto-immunes systémiques**

| Maladie                 | Atteintes organiques majeures                     | Auto-anticorps                              | Référence               |
|-------------------------|---|---|-------------------------|
| Polyarthrite rhumatoïde | Articulations +++<br>Poumons, cœur, œil           | Facteurs rhumatoïdes<br>Anti-CCP            | (Picerno et al. 2015)   |
| Lupus érythémateux      | Articulation, peau,<br>reins+++ hématologique     | Anti-nucléaire<br>Anti-ADN natif<br>Anti-Sm | (Relle et al. 2015)     |
| Gougerot-Sjögren        | Glandes salivaires++,<br>œil, poumons, vasculaire | Anti-SSA -SSB                               | (Roguedas et al. 2006)  |
| Sclérodermie            | Peau+++ , intestins,<br>poumons                   | Anti-centromère                             | (Pope and Johnson 2015) |
| Polymyosite             | Muscle+++ , peau,<br>poumons cœur                 | Anti-synthétase                             | (Vattemi et al. 2014)   |

## 5. Diagnostic

Le diagnostic des pathologies auto-immunes est difficile de par l'hétérogénéité des signes cliniques et les différences interindividuelles. Les diagnostics se posent souvent sur des critères ou des scores cliniques et biologiques plus ou moins précis édités par des sociétés savantes. En plus de tous les examens cliniques et des signes qui seront plus ou moins spécifiques de ces pathologies, l'examen biologique le plus évocateur qui posera un diagnostic reste la recherche d'auto-anticorps. Ces anticorps peuvent être pathogéniques ou témoins de la maladie, ils servent de critères biologiques et sont assez spécifiques. Il est important de souligner que certaines variables doivent être prises en compte dans l'interprétation des tests de recherche d'anticorps. D'abord, la sensibilité du test, c'est-à-dire sa capacité à ne donner des résultats positifs que lorsqu'il y a présence de l'élément à doser (vrai positifs). Ensuite sa spécificité, c'est-à-dire sa capacité à ne réagir qu'avec l'élément à doser (vrai négatifs). Enfin sa valeur prédictive, mais cela dépend de la pathologie, de l'individu et de l'élément à doser (Y-a-t-il toujours sécrétion de ce type d'anticorps pendant cette pathologie ?).

Dans les MAI spécifiques d'organes, les auto-anticorps sont souvent la cause de la pathologie et leur identification confirme le diagnostic. Les anticorps les plus recherchés suite aux éléments cliniques évocateurs sont présentés dans le tableau 1.

Dans les MAI systémiques, les auto-anticorps ne sont pas forcément pathogéniques, leur présence peut signer certaines formes de pathologies sans en être la source. Le chevauchement des signes cliniques et l'hétérogénéité de ces pathologies forcent la prescription d'un panel d'auto-anticorps à rechercher pour confirmer l'absence ou la présence de certains syndromes mais ne sont pas toujours spécifiques d'une pathologie ni toujours présents. Les facteurs rhumatoïdes sont retrouvés chez les patients atteints de PR mais aussi

de lupus et chez des personnes saines. Les principaux auto-anticorps recherchés au cours de ces pathologies sont indiqués dans le tableau 2.

## 6. Traitements actuelles

### a. Objectifs des traitements

Le traitement des maladies auto-immunes a plusieurs objectifs : prévenir les poussées de la maladie, s'opposer à l'évolutivité des atteintes viscérales, préserver l'insertion socioprofessionnelle et guérir la maladie tout en évitant les effets indésirables des traitements. Les grandes lignes de ce traitement reposeront sur l'association d'un médicament avec un effet sur le système immunitaire et un traitement symptomatique pour améliorer la prise en charge et le niveau de vie du patient. Il a aujourd'hui dans l'arsenal thérapeutique plusieurs actions possibles sur le système immunitaire : inhiber le système immunitaire globalement par l'utilisation de molécules immunosuppressives ou moduler son action plus subtilement pour le rendre non pathogène. Les dernières avancées dans la thérapeutique des MAI reposent sur l'identification du mécanisme fin de la physiopathologie et de l'utilisation de molécules qui vont cibler de plus en plus certaines voies métaboliques ou antigènes pathologiques. En utilisant des traitements plus ciblés, plus adaptés à la pathologie, les effets secondaires sont réduits et l'impact sur la maladie amélioré. Cependant, le traitement des maladies auto-immunes fait souvent appel à une stratégie d'immunosuppression non spécifique associant habituellement la corticothérapie et les antimétaboliques. Ces traitements ne sont pas dénués d'effets iatrogènes, ce qui limite leur indication aux maladies auto-immunes dites sévères. C'est le dépistage de lésions des « organes nobles » (reins, système nerveux, cœur, systèmes digestif et pulmonaire) qui déterminera la sévérité clinique et donc le choix thérapeutique.

### b. Immunosuppresseurs chimiques

La pharmacie dispose d'un panel assez large en immunosuppresseurs chimiques utilisés depuis longtemps pour 2 indications principales : le rejet de greffe et les maladies auto-immunes. Ces immunosuppresseurs ont différents modes d'action qui feront les différentes indications

Les inhibiteurs de la synthèse d'IL-2 sont les anticalcineurines et sont représentés par la ciclosporine (SANDIMMUN® et NEORAL®) et le tacrolimus (PROGRAF®). Ce sont toutes 2 des substances naturelles retrouvées dans le *Tolypocladium inflatum* pour la ciclosporine et dans les *Streptomyces* pour le tacrolimus. Leur mécanisme d'action est de pénétrer dans le cytoplasme des LTh et se lier à la cyclophiline ou à FKBP, ces complexes se lient à la calcineurine et inhibent son activité phosphatase ce qui empêche NF-AT de rentrer dans le noyau et d'induire la synthèse de nombreuses interleukines dont l'IL-2. Ces molécules ont une marge thérapeutique étroite et des effets secondaires de types néphrotoxiques, d'infections secondaires et carcinogènes, qui sont à prendre en compte lors de leur prescription.

Le sirolimus (RAPAMUNE®) et l'everolimus (CERTICAN®) sont 2 autres molécules qui inhibent l'effet activateur T de l'IL-2. Le sirolimus est extrait du *Streptomyces* et l'everolimus en est un dérivé semi-synthétique. Ils entrent tous les 2 dans le cytoplasme des LTh et se fixent à FKBP12 ; ces complexes inhibent totalement l'activité de mTOR. Le signal de transduction de CD25 lorsque de l'IL-2 s'y fixe est alors inhibé.

Les glucocorticoïdes exercent leur effet immunosuppresseur en diminuant l'expression des gènes codant pour les cytokines IL-1, IL-2, IL-6, INF $\gamma$  et TNF $\alpha$ . Il en résulte une diminution de l'inflammation, de la prolifération lymphocytaire, de l'activité cytotoxique des LTh ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes du CMH. Cette action passe par la fixation des corticoïdes aux *Glucocorticoid response elements* (GRE) cytoplasmiques ; ces



complexes inhibent l'activité des facteurs de transcription pro-inflammatoire Fos et Jun. Cependant cette activité immunosuppressive nécessite de fortes doses et ils ne sont pas dénués d'effets secondaires importants nuisant à la qualité de vie des patients comme par exemple la rétention hydrosodée, la déminéralisation osseuse, un syndrome cushingoïde et des infections opportunistes virales essentiellement.

Les inhibiteurs de la synthèse des bases azotés constituent une autre classe d'immunosuppresseurs utilisée. Ainsi, l'inhibition de la synthèse d'ADN empêchera la prolifération des clones lymphocytaires lors de réaction immunitaires. L'azathioprine (IMUREL®) et le mycophénolate mofétil (CELLCEPT®) inhibent les voies de production des bases puriques. Il en résulte une forte myélotoxicité qui force la surveillance hématologique régulière lors de la mise en place de ces traitements.

Il est à noter que beaucoup d'autres médicaments « chimiques » sont utilisés dans le traitement des MAI. Certains antipaludéens sont utilisés dans le traitement du lupus notamment pour leur activité immunomodulatrice. Il y a aussi tous les autres médicaments utilisés en soutien, symptomatiques, comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les antalgiques dont le but thérapeutique est l'amélioration du niveau de vie avec la maladie.

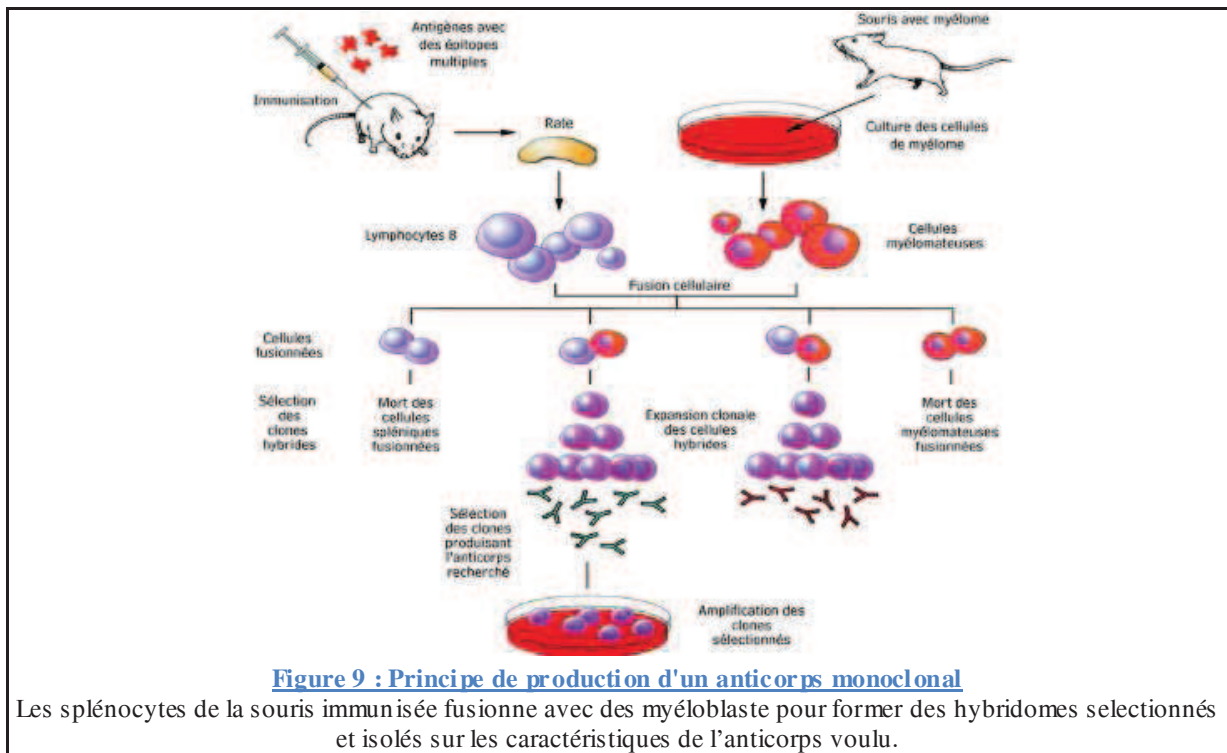
### c. Biothérapies

Les biothérapies sont une classe de médicaments représentés par beaucoup de molécules avec une grande diversité d'origine et de mécanismes d'action. Dans ce travail nous nous focaliseront sur une famille particulière de biothérapies, les anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux sont les biothérapies les plus spécifiques car les plus ciblées et sont, aujourd'hui, en plein essor dans leur utilisation thérapeutique dans la modulation immunitaire et en thérapie anti-tumorale. 35 anticorps monoclonaux ont déjà reçu

une autorisation de mise sur le marché en France et 350 autres molécules sont en cours de demande. Avec l'explosion du nombre de molécules disponibles, les schémas thérapeutiques vont radicalement changer d'ici peu.

C'est en 1975 que Georges Köhler et César Milstein ont publié dans *Nature* une technique de production d'anticorps monoclonaux (Köhler and Milstein 1975). En 1984, ils ont reçu le Prix Nobel de médecine pour cette découverte. Les anticorps monoclonaux en thérapeutique existent depuis les années 1980 dans des protocoles d'essais cliniques. Leur mode de fabrication en fait des biomédicaments difficiles à produire à l'échelle industrielle mais les techniques évoluent et aujourd'hui, une grande majorité des laboratoires pharmaceutiques sont impliqués dans le développement d'un ou plusieurs anticorps monoclonal. Ils en existent différents types et sont classés en fonction de la part d'origine murine et humaine dans la composition de l'anticorps. Les premiers anticorps étaient complètement de souris (suffixe –momab) puis des techniques d'humanisation se sont développées pour augmenter la tolérance des patients au médicament notamment au moment de l'injection. Il y a les anticorps chimériques (suffixe –ximab), les anticorps humanisé (suffixe –zumab) et enfin les anticorps complètement humain (suffixe –mumab). Le principe de leur production est basé sur l'immunisation de souris (Figure 9). Les cellules spléniques sont ensuite fusionnées avec des myéloblastes pour créer un hybridome immortel cultivable et producteur de l'anticorps de la souris immunisée. Les hybrides sont ensuite sélectionnés sur l'affinité des anticorps produits sur l'antigène d'intérêt puis isolés pour ne produire que l'anticorps voulu. Les techniques d'humanisation des anticorps sont plus complexes et nécessitent des réarrangements géniques. Les séquences des régions hypervariables de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'anticorps sont insérées dans un plasmide contenant le reste de la séquence des parties constantes d'un anticorps humain avec l'isotype choisi pour la meilleure efficacité *in vivo* possible et la meilleure tolérance au traitement.



Il s'agit du principe historique de production des anticorps monoclonaux. Aujourd'hui, des techniques de sélection d'anticorps d'intérêt par la création de librairie de phage sur lesquelles sont testés tous types d'anticorps et notamment de sang de cordon permet d'identifier de nouveaux anticorps spécifiques d'un antigène à partir d'anticorps humains avec la plus forte diversité.

Les principaux anticorps monoclonaux utilisés dans le traitement des MAI sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous :

| <b>Tableau 3 : Principaux anticorps monoclonaux utilisés dans le traitements de MAI</b> |                          |  |      |
|---|--------------------------|--|------|
| Anticorps   | Cible                    | Indications                                      | AMM  |
| Belimumab   | B-cell activating factor | Lupus  | 2014 |
| Natalizumab   | Integrine $\alpha 4$     | Crohn, SEP                                       | 2012 |
| Alemtuzumab   | CD52                     | SEP  | 2012 |
| Eculizumab  | C5 complement            | hémoglobinurie                                   | 2012 |
| Omalizumab  | IgE                      | Asthme, allergie                                 | 2012 |
| Basilixumab   | IL-2R (CD25)             | greffe   | 1998 |
| Daclizumab  | IL-2R (CD25)             | greffe   | 2003 |
| Belatacept  | CTLA4-Ig                 | greffe   | 2014 |
| Muronomab-CD3   | CD3                      | greffe   | 1986 |
| Romiplostin   | TPO-Ig                   | PTAI   | 2009 |
| Tocilizumab   | IL-6R                    | PR   | 2014 |
| Certolizumab  | TNF $\alpha$             | PR   | 2010 |
| Adalimumab  | TNF $\alpha$             | PR, arthrite juvénile, psoriasis, crohn          | 2013 |
| Infliximab  | TNF $\alpha$             | PR, psoriasis, crohn RCH                         | 2012 |
| Golimumab   | TNF $\alpha$             | PR, spondylarthrite, crohn, RCH                  | 2014 |
| Rituximab   | CD20                     | lymphome, leucémie, PR, lupus, MBAI, vascularite | 1998 |
| Ustekinumab   | IL-12 et IL-23           | psoriasis  | 2011 |

Une nouvelle approche dans le traitement des maladies auto-immunes à auto-anticorps est la déplétion des lymphocytes B. Initialement prévue pour le traitement des lymphomes B dont la déplétion B entraînait la disparition simple des cellules cancéreuses, cette thérapeutique s'est vite étendue aux pathologies auto-immunes comme le lupus ou la PR pour stopper la production d'auto-anticorps (Hagemester 2010; Leandro et al. 2005; Joly et al. 2007; Sutter et al. 2008; Teeling et al. 2004; Teng et al. 2009; Zwick et al. 2010). Un des premiers anticorps de déplétion des LB est le rituximab (RTX) qui cible le CD20 des LB.

Le rituximab (MABTHERA® Roche®) anti-CD20 :

Le CD20 est un marqueur B spécifique exprimé du stade préB jusqu'au LB mature, son expression diminue voire disparaît chez les plasmocytes. Le CD20 est une molécule membranaire qui s'organise en homo-dimère ou -tétramère et interagit avec d'autres molécules membranaires comme le CMH, CD40 et le BCR (Li et al. 2004:20; Petrie and Deans 2002; Walshe et al. 2008). Sa fonction n'est pas encore bien déterminé mais il semble qu'il soit associé au BCR jusqu'à son engagement sur un antigène puis module la concentration calcique intra-cytoplasmique du LB pour contrôler le cycle cellulaire (Polyak et al. 2008).

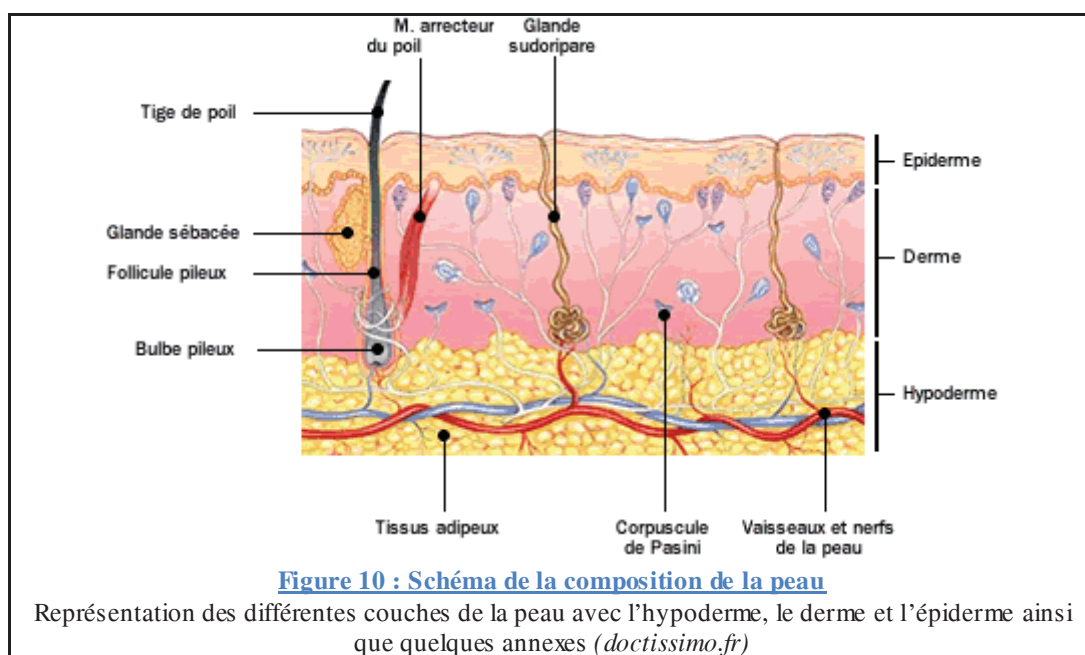
Le rituximab (RTX) (MABTHERA®) est un anticorps monoclonal anti-CD20 développé et commercialisé par Roche® en France et Genetech® aux Etats-Unis. Il a obtenu une AMM européenne en 1998 pour son utilisation dans les hémapathies malignes B. Il s'agit d'un anticorps chimérique d'isotype IgG1 dirigé contre le CD20 et pèse 144 kDa. Il induit une déplétion B sur une période de 3 mois à 1 an par plusieurs mécanismes. i) la liaison du RTX aux LB entraîne la formation d'un complexe immun et recruter le composant C1q du complément pour lyser le LB. ii) la liaison de la région constante de l'anticorps (Fc) à un récepteur FcγR conduit à la destruction du LB fixé par cytotoxicité cellulaire dépendantes des anticorps (ADCC). iii) la fixation du RTX au CD20 entraîne un changement de la conformation du CD20 et augmente la concentration de calcium intra-cytoplasmique et bloque ainsi le cycle cellulaire en phase S (Alduaij and Illidge 2011). Le retour des LB, environ 9 mois après l'injection, est caractérisé par un forte augmentation de la population B naïve CD5<sup>+</sup> et CD38<sup>high</sup> marqueurs des populations transitionnelles.

## II. Les Maladies auto-immunes bulleuses

### A. La peau

La peau est l'enveloppe externe du corps. Cette enveloppe est en continuité avec les muqueuses et représente l'organe le plus lourd de l'organisme, soit environ un tiers du poids total pour une surface totale de 2m<sup>2</sup> chez l'adulte. Cet organe a des annexes qui comprennent les phanères (poils, cheveux et ongles) ainsi que les glandes sébacées et sudoripares.

La peau est organisée en 4 régions superposées de la profondeur vers l'extérieur : l'hypoderme, le derme, la jonction dermo-épidermique (JDE) et l'épiderme (Figure 10).

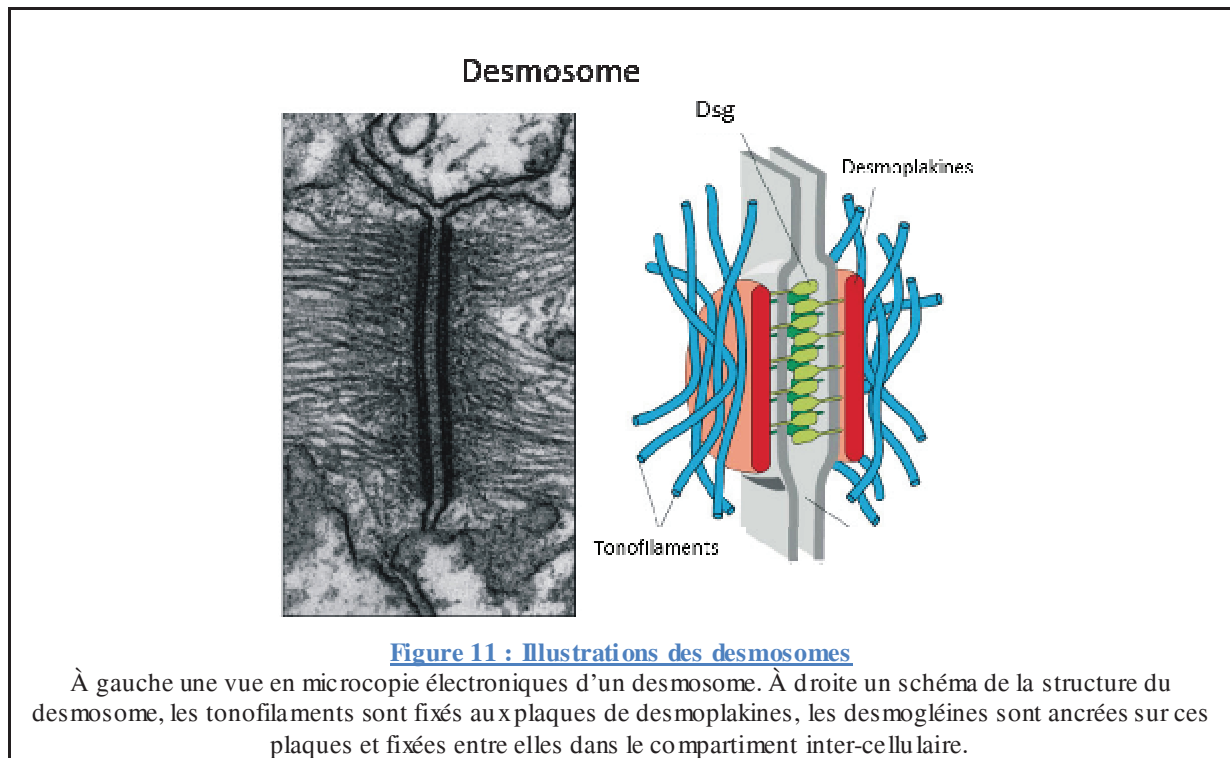


#### 1. L'épiderme

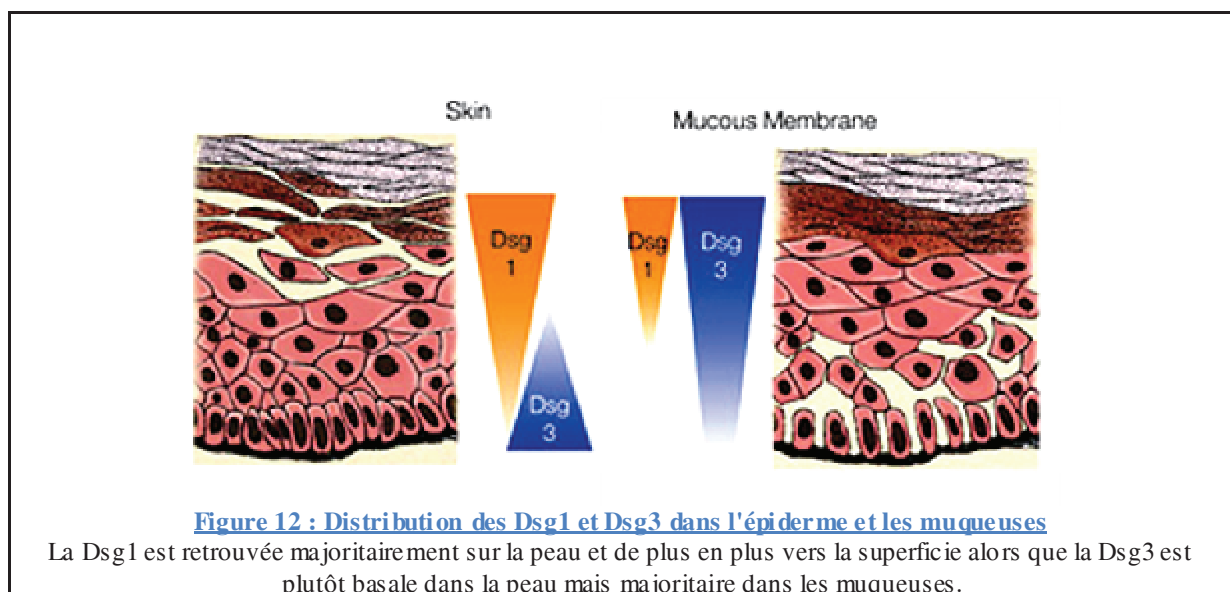
L'épiderme est un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux et kératinisé constitué de 4 types cellulaires : Les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

Les kératinocytes sont les cellules majoritaires de l'épiderme et en constituent environ 80%. Ils assurent la cohésion et la protection de l'épiderme contre tous les types d'agressions

extérieurs (physiques et chimiques). Ces kératinocytes se répartissent en 4 couches dans l'épiderme. La couche basale est directement en contact avec la JDE, les kératinocytes s'y trouvant assurent l'adhésion de l'épiderme et le renouvellement cellulaire avec un fort taux de mitose. La couche spinieuse est constituée de plusieurs assises de kératinocytes polygonaux. La couche granuleuse correspond à plusieurs assises cellulaires de kératinocytes ayant dans leur cytoplasme des granules basophiles. Enfin la couche cornée dans laquelle les kératinocytes sont aplatis et anucléés en contact avec l'extérieur. Les éléments qui maintiennent les kératinocytes entre eux et donc la cohésion de la peau sont les desmosomes et hémidesmosomes. Ce sont les systèmes de jonction sur lesquels s'ancrent les tonofilaments qui font le cytosquelette des kératinocytes. Les desmosomes se présentent toujours comme des structures symétriques avec de part et d'autre d'une ligne dense extracellulaire, une zone claire aux électrons dénommée desmogléie, la membrane cytoplasmique des kératinocytes et une plaque accolée à la face interne de cette membrane sur laquelle s'accrochent des filaments intermédiaires. Les desmosomes sont très nombreux dans la couche spinieuse et expliquent les « épines » visibles au microscope et deviennent cornéo-desmosomes dans les couches plus superficielles. Les tonofilaments sont composés de cytokératines associées en paires qui forment ensemble une partie du cytosquelette de la cellule. Dans la composition des desmosomes, il est important de citer les desmogléines (Dsg1 à 4) et les desmocollines. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de la famille des cadhérines qui assurent l'adhésion intercellulaire en se fixant aux Dsg de la cellule adjacente. Les desmoplakines et plakoglobines forment les plaques d'ancrage des Dsg à l'intérieur du cytosol des kératinocytes (Figure 11).



Il est à noter que les proportions de chaque Dsg dans la composition des desmosomes est tissu-dépendante. En effet, il est retrouvé une majorité de Dsg1 dans l'épiderme et sa concentration augmente en allant vers l'extérieur, la Dsg3 est exprimé dans les couches basales. Les muqueuses montrent des profils différents d'expression des Dsg, la Dsg3 est majoritaire dans toutes les couches et il est retrouvé une faible expression de la Dsg1 dans les couches muqueuses les plus superficielles (Figure 12).





Les mélanocytes constituent la deuxième grande population de l'épiderme. Leur rôle est la photo-protection de l'organisme par la synthèse des mélanines : phéomélanines (pigments jaunes) et eumélanines (pigments bruns). La mélanine est transférée par les mélanocytes vers les kératinocytes par l'intermédiaire d'organites sécrétés. Sous l'action de radiations lumineuses trop fortes, les phéomélanines deviennent carcinogènes et expliquent le développement de certains cancers de la peau.

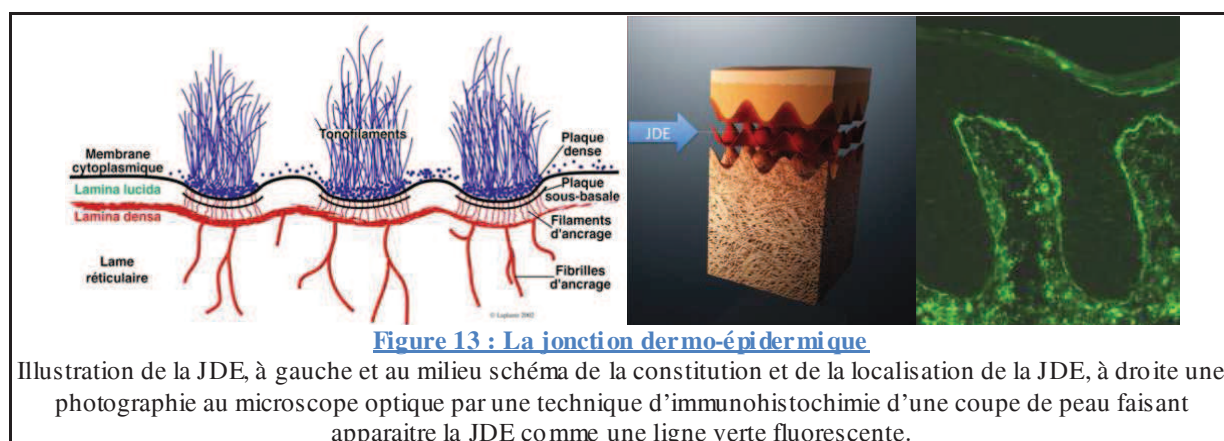
Les cellules de Langerhans, troisième population cellulaire de l'épiderme, représentent 3 à 8% des cellules épidermiques. Leur densité varie de 200 à 1000 cellules/mm<sup>2</sup> selon leur localisation anatomique. Elles appartiennent au groupe des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes transépithéliales, c'est-à-dire qu'elles migrent de tissu pour présenter des antigènes phagocytés. Les cellules de Langerhans, produites au niveau des organes hématopoïétiques, migrent vers l'épiderme où elles vont capturer les exo-antigènes et les apprêter dans un complexe CMH de classe II. Elles vont ensuite rejoindre les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène aux LTh pour activer une réponse immune. Leur localisation épidermique s'explique par l'expression de molécules d'adhérence, telle l'E-cadhérine, qui leur permet une adhérence homotypique avec les kératinocytes. Les granules de Birbeck expriment intensément une lectine de type II/C, la langerine, qui leur est spécifique. Elles expriment aussi beaucoup de TLRs qui transmettent un signal de danger, induisant leur maturation phénotypique et fonctionnelle. Les différentes familles de récepteurs exprimés par les cellules de Langerhans sont capables de reconnaître ou d'internaliser différents pathogènes : la langerine, permet notamment la capture d'antigènes glycolipidiques dérivés des mycobactéries ou la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du virus VIH alors que les récepteurs aux fragments Fc des Ig et les récepteurs au complément (CR) permettent la reconnaissance de pathogènes ou de corps apoptotiques opsonisés.

Les cellules de Merkel constituent la dernière population épidermique. Ce sont des cellules neuro-épithéliales avec un rôle de mécanorécepteur relié à une terminaison nerveuse. Les cellules de Merkel sont irrégulièrement réparties dans l'épiderme ; elles sont particulièrement abondantes au niveau des lèvres, des paumes, de la pulpe des doigts et du dos des pieds.

Les altérations auto-immunes des molécules constituant le derme constitue le groupe des dermatoses bulleuses intra-épidermiques autrement dit les Pemphigus.

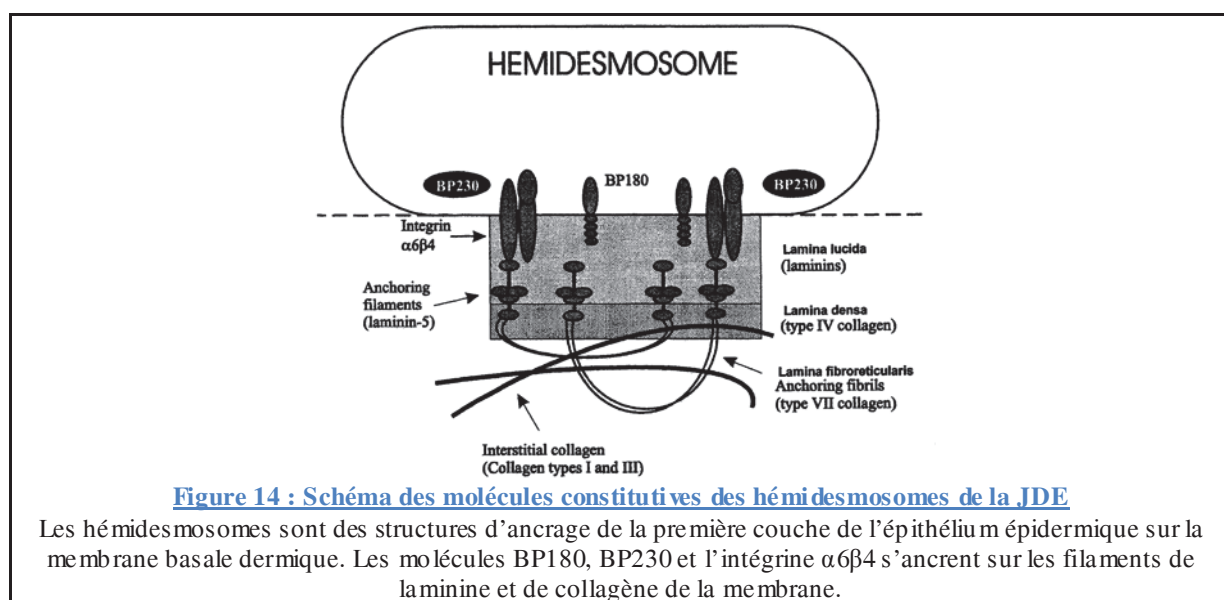
## 2. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique (JDE) est la structure séparant l'épiderme du derme sous-jacent. Elle apparaît entre les kératinocytes basaux et le derme papillaire comme une ligne ondulée, fine et homogène où alternent les saillies de l'épiderme dans le derme dites "crêtes épidermiques" et les saillies du derme dans l'épiderme dites "papilles dermiques". Elle comprend : la membrane cytoplasmique des cellules basales de l'épiderme (kératinocytes, mélanocytes et cellules de Merkel), la *lamina lucida* claire aux électrons, la *lamina densa* dense aux électrons. La JDE présente au niveau des kératinocytes basaux des complexes d'ancrage de l'épiderme sur le derme, constitués par un hémidesmosome, des filaments d'ancrage, un épaissement de la *lamina densa*, des fibrilles d'ancrage et des plaques d'ancrage dermique (Figure 13).



Les études immuno-histochimiques ont montré qu'il existait au niveau de la jonction dermo-épidermique des constituants spécifiques des hémidesmosomes, différents des constituants universels des membranes basales, particulièrement importants dans le maintien de l'intégrité dermo-épidermique et notamment : (Figure 14)

- L'antigène de la Pemphigoïde bulleuse BP230 (ou BPAG1) au niveau de la plaque d'ancrage des tonofilaments des hémidesmosomes.
- L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  et l'antigène de la Pemphigoïde bulleuse BP180 (ou BPAG2 ou collagène XVII), molécules transmembranaires des hémidesmosomes.
- La laminine 5 au niveau des filaments d'ancrage.
- Le collagène VII au niveau des fibrilles d'ancrage.



Les altérations, d'origine génétique ou auto-immune, de ces molécules assurant la cohésion entre l'épiderme et le derme aboutissent à des dermatoses bulleuses sous-épidermiques dont la plus commune est la Pemphigoïde bulleuse.

### 3. Le derme et l'hypoderme

Le derme et l'hypoderme sont des tissus conjonctifs richement vascularisés et innervés. Ils sont constitués de fibres, de cellules et de la substance fondamentale. Il existe 3 types de fibres : élastiques, de « collagène » et de « réticuline ». Elles n'ont pas tout à fait le même

rôle, certaines assurent plutôt le maintien et d'autres l'élasticité, leurs distributions sont différentes. Les cellules qui peuplent le derme et l'épiderme sont soit fixes d'origine mésenchymateuse, soit mobiles d'origine hématopoïétique. Le derme a en moyenne une épaisseur de 1 à 2 mm ; il est particulièrement fin au niveau des paupières et du prépuce et en revanche très épais au niveau des plantes des pieds. Le derme se continue par l'hypoderme sans limite franche ; ce dernier s'étend jusqu'aux plans aponévrotiques ou périostés sauf au niveau des paupières, des oreilles et des organes génitaux masculins, où il n'y a pas d'hypoderme.

## B. Les maladies auto-immunes de la peau

Les maladies bulleuses auto-immunes (MBAI) représentent un groupe de MAI spécifiques d'organes dont l'organe cible est la peau. Les MBAI sont très hétérogènes, peu fréquentes et dont le pronostic vital est très variable. Les MBAI sont caractérisées cliniquement par l'apparition de bulles cutanées et d'érosions de la peau liées à la production d'auto-anticorps dirigés contre différents constituants de l'épiderme, de la JDE ou parfois dans le derme. La diversité des MBAI impose, pour leur diagnostic précis, une enquête clinique, anatomopathologique et immunologique. Ces MBAI sont classées en fonction du site de clivage (dépôt des auto-anticorps) et il est distingué 2 groupes majeurs :

- Les MBAI intra-épidermiques qui constituent le groupe des pemphigus. Les cibles antigéniques sont les Dsg1&3 constituants des jonctions inter-kératinocytes (desmosomes).
- Les MBAI sous-épidermiques dans lesquelles les cibles antigéniques sont des composants de la JDE.

Ces maladies sont caractérisées cliniquement par la présence de bulles sur la peau. Une bulle est une collection liquidienne superficielle de plusieurs millimètres de diamètre

siégeant sur la peau ou les muqueuses. Ces bulles sont à contenu clair ou séro-hématique. Il faut cependant évoquer une MBAI devant une érosion post bulleuse mais aussi devant un vaste décollement épidermique. La bulle peut résulter d'un clivage entre le derme et l'épiderme à la JDE (MBAI sous-épidermique : Pemphigoïde bulleuse) et formera des bulles tendues à contenu le plus souvent clair. La bulle peut aussi résulter d'un clivage intra-épidermique (MBAI intra-épidermique : les pemphigus), elle sera flasque et fragile. Le signe de Nikolsky correspond à un décollement cutané provoqué par le frottement appuyé de la peau saine. Il traduit un décollement intra-épidermique (acantholyse) au cours des pemphigus. Pour le diagnostic des MBAI, il est important d'éliminer les dermatoses bulleuses non-auto-immunes. Il en existe différentes sortes : les toxidermies bulleuses, la porphyrie cutanée tardive, les dermatoses bulleuses causées par des agents externes, les épidermolyses héréditaires, les érythèmes polymorphes bulleux. Il peut aussi exister des formes bulleuses de maladies habituellement non bulleuses comme certaines dermatoses vésiculeuses ou certaines vasculites nécrotico-bulleuses.

Les éléments permettant le diagnostic de ces pathologies reposent sur l'interrogatoire et l'examen clinique qui orienteront le clinicien mais la confirmation du diagnostic sera posée par des examens complémentaires histologiques et immunologiques que sont la biopsie d'une bulle, la biopsie d'une peau péribulleuse pour une immunofluorescence directe (IFD) et le prélèvement sanguin pour une recherche d'auto-anticorps en immunofluorescence indirecte (IFI) ou ELISA ou western blot. D'autres examens sont possibles comme l'IFI sur peau humaine normale clivée par la soude ou un immunotransfert pour étudier la cible précise des auto-anticorps.

## C. Les Maladies auto-immunes bulleuses intra-épidermiques : les Pemphigus

Les MBAI intra-épidermiques constituent le groupe des pemphigus, il en existe de différents types : le Pemphigus vulgaris (PV), le Pemphigus superficiel ou foliacé (PF), le Pemphigus para-néoplasique (PNP) et plus rare le pemphigus induit par les médicaments.

### 1. Clinique

Le pemphigus vulgaire (PV) est le plus fréquent des pemphigus, son incidence varie de 0,7 à 5 nouveaux cas par millions d'habitants par an, l'âge moyen de déclenchement de la pathologie est de 50 ans même si des formes pédiatriques existent et sont largement décrites. Le PV touche autant les hommes que les femmes avec un sexe ratio de 1. Son déclenchement clinique commence insidieusement par des lésions muqueuses le plus souvent buccales mais aussi œsophagiennes et génito-rectales à types d'érosions douloureuses handicapantes. La forme classique du PV ne touche que les muqueuses mais certaines formes de PV évoluent et deviennent cutanéomuqueuses. Dans ce cas, l'atteinte cutanée est plus tardive, plusieurs semaines à plusieurs mois après les premières lésions muqueuses. Le PV développe des bulles flasques à contenu clair siégeant sur la peau saine, ces bulles sont fragiles et laissent rapidement apparaitre des érosions post-bulleuses cernées par une collerette épidermique avec un signe de Nikolsky positifs autour des lésions (Figure 15). La mortalité du pemphigus en général est de 5% et est majoritairement due à des effets iatrogéniques.



**Figure 15 : Lésions du Pemphigus vulgaris**

Le pemphigus vulgaris touche la peau et les muqueuses, à gauche des lésions de la muqueuse gingivale et à droite des lésions érosives post bulleuses siégeant sur le thorax (*Dermis.net*)

Le pemphigus superficiel ou foliacé (PF) regroupe les variants séborrhéique, érythémateux, foliacé et herpétiforme du pemphigus. Il représente environ 25% des cas de pemphigus. Le pemphigus superficiel n'affecte que la couche superficielle de l'épiderme et sa présentation clinique est variable. Les bulles formées sont très fugaces et inconstantes, rapidement remplacées par des lésions squamo-croûteuses, souvent prurigineuses, distribuées sur les zones séborrhéiques non muqueuses : thorax, visage, cuir chevelu, région interscapulaire (Figure 16). Il n'existe habituellement pas d'atteinte muqueuse. Dans les formes sévères, le tableau clinique est celui d'une érythrodermie squameuse. Tout comme pour le PV, le signe de Nikolsky apparait positif.



Le pemphigus paranéoplasique est une des formes les plus graves et brutales du pemphigus et extrêmement rare sans prévalence connue. Cette forme de pemphigus a été décrite plus tardivement dans les années 1990 (Anhalt et al. 1990). Il est souvent associé à différents types de proliférations malignes, notamment des hémopathies lymphoïdes. Les signes cliniques sont très variables. La maladie se manifeste presque systématiquement par des lésions muqueuses diffuses et graves dans la bouche, sur les lèvres et dans l'œsophage, les atteintes oculaires sont fréquentes. Les lésions cutanées sont variables, et souvent trompeuses

: éruption lichénoïde, bulleuse, de type urticaire, ou évoquant un érythème polymorphe. Les poumons peuvent être touchés (30 à 40% des cas), ainsi que et le système gastro-intestinal.

## 2. Physiopathologie

C'est en 1964 que les travaux de Beutner et Jordon mettent en évidence la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes intercellulaires de l'épithélium Malpighien. Les antigènes épithéliaux sont les desmoglénines (Dsg) classées de 1 à 4. Les cibles principales du PV sont les Dsg1 & Dsg3, et explique les atteintes sur les muqueuses et la peau kératinisée ; alors que dans le PF, la cible principale est la Dsg1 qui est retrouvée essentiellement dans les couches les plus superficielles des peaux kératinisées et explique les atteintes sur la peau normale ainsi que le clivage dans la couche granuleuse épidermique à l'histologie. Lorsque que les auto-anticorps existent contre la Dsg1 et la Dsg3, on parle alors de forme cutanéomuqueuse du pemphigus. (Amagai et al. 1999). De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence les processus physiopathologiques menant à la formation des bulles et à l'acantholyse épidermique lors du pemphigus. L'équipe de Moncada en 1982 met en évidence le passage transplacentaire d'anticorps maternels (atteinte de pemphigus) au fœtus provoquant des atteintes épidermiques chez le nouveau-né (Moncada et al. 1982). Il a eu le développement de nombreux modèles expérimentaux visant à évaluer la pathogénicité des anticorps anti-Dsg. Les premiers modèles *in vitro* ont montré la pathogénicité des IgG anti-Dsg sur des kératinocytes en culture (Schiltz and Michel 1976). *In vivo*, les transferts passifs d'anticorps de patients à des souris ont démontré le rôle des auto-anticorps IgG anti-Dsg (Anhalt et al. 1990), cependant l'implication du complément et de protéases a fait débat dans le mécanisme pathologique. Des expériences de transferts de fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps anti-Dsg à des souris C5<sup>-/-</sup> ont montré que la formation de bulles ne nécessitait ni le fragment Fc des anticorps (recrutement d'acteurs secondaires par le FcR) ni le système complément (Anhalt et al. 1986). Il a été également montré que les anticorps anti-Dsg3



n'étaient pas tous capables d'induire la formation de bulles. En effet, seuls les anticorps dirigés contre les fragments N-Terminaux (Dsg3 [1-88]) induisaient la formation de bulles par destabilisation physique et gêne stérique au niveau des sites d'adhérence inter-Dsg contenus dans la zone N-Terminale de la Dsg (Sekiguchi et al. 2001). Les anticorps ciblant la partie C-Terminale (Dsg3 [87-566]) n'induisent pas la formation de bulles mais sont aujourd'hui considérés comme précurseurs de la pathogénicité. Ainsi par « *epitope spreading* », la partie N-Terminale serait ciblée secondairement. Cette théorie est appuyée par le fait qu'il existe des LTh anti-Dsg3 et que un seul LTh peut induire une réponse B polyclonale. Le LB agissant comme une CPA, il peut se produire un phénomène de rétrocontrôle positif entre les LB et LTh Dsg3-spécifiques et ainsi accélérer la sécrétion d'auto-anticorps pathogéniques dirigés contre la partie N-Terminale de la Dsg3 (Takahashi, Kuwana, and Amagai 2009). Les auto-anticorps anti-Dsg3 ont fait l'objet de beaucoup d'études pour mieux comprendre leur diversité génétique, leur mécanisme de sélection clonal et leur pathogénicité fonctionnelle sur des modèles d'inhibition d'ELISA ou de transfert passif (Di Zenzo et al. 2012; Payne et al. 2005; Qian et al. 2007). Ces études ont montré l'utilisation d'un répertoire restreint de gènes VH, DH et JH par les LB spécifiques de la Dsg3 provenant certainement de quelques précurseurs LB communs sélectionnés qui ont subi des mutations indispensables pour leur liaison à la partie N-Terminale de la Dsg3. Cependant la famille VH1-46 est retrouvée partagée sur les auto-anticorps anti-Dsg3 par 4 patients atteints de PV dans une étude de l'équipe de Payne AS en 2014 et met en évidence que ces anticorps n'ont besoin que de peu de mutations ou pas pour avoir une affinité suffisante pour la Dsg3 et favoriseraient leur sélection précoce dans le mécanisme pathogénique (Cho et al. 2014).

### Techniques d'analyses des séquences d'anticorps de patients :

Différentes techniques permettent aujourd'hui l'analyse d'un répertoire immunitaire global ou antigène-spécifique. Historiquement, la technique d'analyse qualitative du répertoire global lymphocytaire est l'immunoscope. Cette technique permet de conclure sur le caractère oligo- ou polyclonal des B circulant par PCR simultanée de tous les CDR3 (régions hypervariables) des BCR présents dans l'échantillon. Cependant, dans les études de MAI, beaucoup de travaux ont été effectués sur les répertoires restreints à un antigène. Ces analyses peuvent fournir des indices ou des éléments de compréhension du mécanisme déclencheur de l'auto-immunité, de l'évolution des clones B sélectionnés sur l'antigène de la MAI et beaucoup d'autres éléments biologiques intéressants.

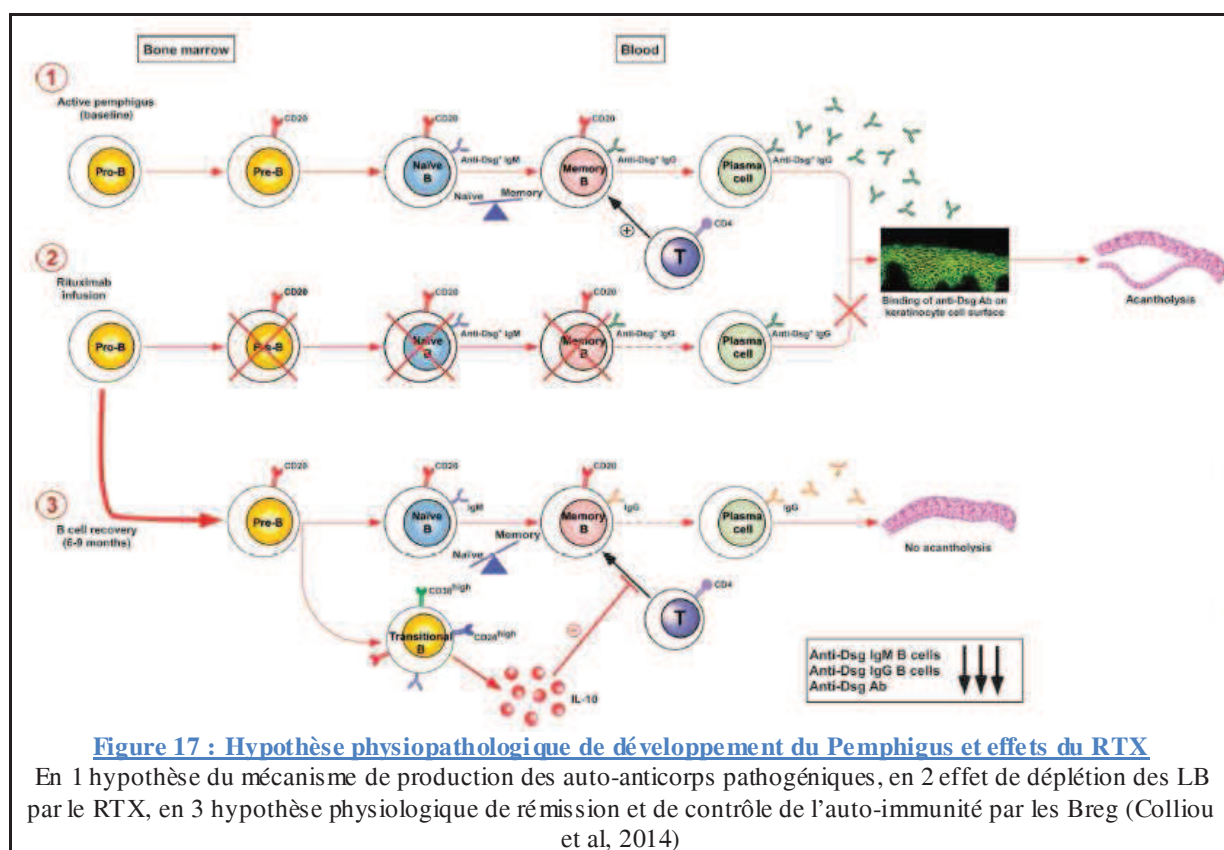
La difficulté de ces techniques repose sur l'isolement de la fraction antigène spécifique du répertoire B, c'est-à-dire le *screening*. Il est possible de produire biologiquement des antigènes recombinants qui sont marqués soit par un fluorochrome directement soit par des motifs peptidiques permettant la fixation ultérieure de fluorochromes comme les queues poly-Histidine. L'incubation des LB circulant avec le peptide permet le marquage de la population B spécifique du peptide et son tri au cytomètre trieur cellule par cellule. Les séquences des BCR sont ensuite récupérées par une rétro-transcription de l'ARN, puis une « nested PCR » qui sert à amplifier la séquence du CDR3 de la chaîne lourde d'immunoglobuline pour pouvoir la séquencer par la méthode Sanger. Aujourd'hui il n'y a plus besoin de trier les cellules par cellules (cela provoque une forte perte de LB spécifiques), et des techniques de séquençage haut débit permettent d'isoler toutes les séquences à partir d'un *bulk*. La technique de criblage par *phage display* permet aussi d'isoler les LB spécifiques d'un antigène et est aussi largement utilisée pour analyser toutes sortes d'interactions moléculaires. Les gènes des BCR sont extraits à partir d'un échantillon de LB et insérés dans des phages qui exprimeront la chaîne légère ou la chaîne lourde des anticorps de ces LB. Les phages exprimant des chaînes d'Ig sont ensuite mis en compétition sur la fixation à un antigène d'intérêt et seuls ceux qui montrent la plus grande affinité sont isolés. Cette technique permet aussi la production à large échelle de la chaîne d'immunoglobuline voulue et est utilisée pour produire les anticorps monoclonaux entièrement humanisés.

Certaines études ont montré que la présence des seuls anticorps anti-Dsg utilisés sur des kératinocytes en cultures n'induisait pas une acantholyse aussi forte qu'avec l'utilisation de tout de sérum des patients. Cette découverte fait penser qu'il y a d'autres cibles antigéniques non-Dsg impliquées dans le mécanisme du décollement épidermique et de l'acantholyse. Plus récemment, il a été mis en évidence une nouvelle cible antigénique dans le pemphigus : les récepteurs à l'acétylcholine (AchoR) membranaires des kératinocytes. La formation de bulles et l'acantholyse kératinocytaire seraient liées à la présence conjointe des anticorps anti-AchoR qui dévoilent les desmosomes et des anticorps anti-Dsg qui cassent les liaisons inter-kératinocytaires (Baroni et al. 2007).

Une des questions fondamentales dans le mécanisme physiopathologique de la PV, comme des autres maladies auto-immunes, reste vis-à-vis de l'élément déclencheur de l'auto-immunité. Beaucoup d'études se sont concentrées sur la fonctionnalité et l'implication des LT anti-Dsg3 et de leurs systèmes de régulation. Les travaux de Yokoyama ont démontré en 2011 que des Treg récupérés d'une souris Dsg3<sup>-/-</sup> étaient capables d'inhiber la sécrétion d'IgG anti-Dsg3 in vivo par transfert à une souris qui produit activement ces auto-anticorps (Yokoyama et al. 2011).

Des études génétiques ont montré une prédisposition à développer un pemphigus porté par les gènes qui codent les molécules du système HLA de classe II. Les allèles HLA-DRB1\*04/08/14 confèrent une prédisposition à développer un PV alors que les allèles HLA-DRB1\*03/07/15, HLA-B\*50 et HLA-DBQ1\*02 sont plutôt protecteur vis-à-vis du développement d'un PV (Yan, Wang, and Zeng 2012; Koc et al. 2013). Ces études semblent assez population dépendante mais révèlent que certaines molécules du CMH peuvent présenter la Dsg3 de différentes manières et inhiber ou activer la réponse pathogénique anti-Dsg.

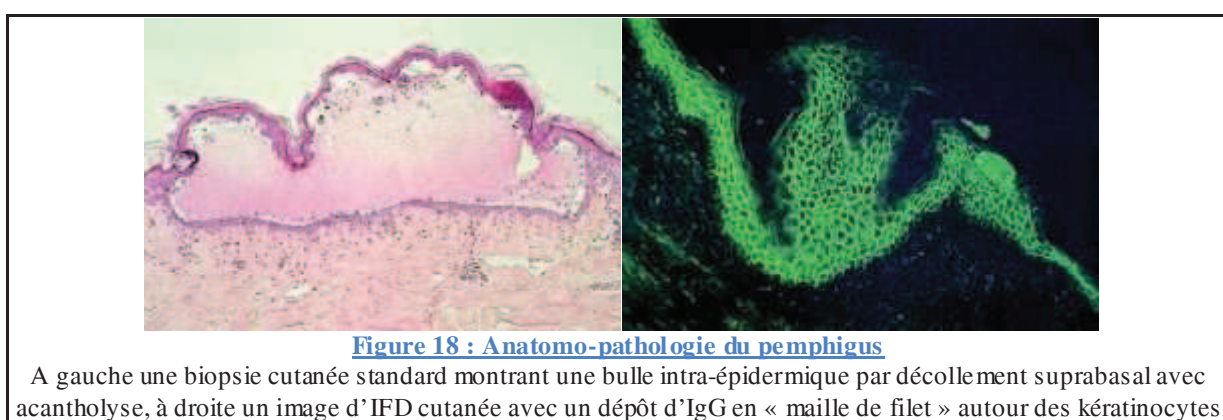
Une étude menée par notre laboratoire sur des patients atteints de PV traités par RTX (Colliou et al. 2013) a montré une modification de la balance LB naïfs / LB mémoires en faveur des naïfs qui reste modifiée même 5 ans après la prise de RTX chez les patients répondeurs. De plus, il est retrouvé une fréquence de LB sécréteurs d'IL-10 plus importante chez les patients en rémission complète que chez les patients non répondeurs. Ces cellules ont été impliquées dans de nombreux processus régulateurs de l'auto-immunité et leur rôle dans le contrôle de la maladie ou leur défaillance au cours de la pathologie reste à démontrer (Figure 17).



### 3. Diagnostic et traitement

Le diagnostic est posé sur la corrélation de différents examens. L'examen clinique doit montrer des bulles ou des érosions post-bulleuses caractéristiques. Le diagnostic est confirmé sur la biologie et l'examen histologique qui montre une bulle intra-épidermique supra-basale pour le PV et dans la couche granuleuse de l'épiderme pour le PF dans laquelle il est retrouvé

des kératinocytes détachés dans la bulle qui signent l'acantholyse. L'étude IFD d'une biopsie de peau péri-bulleuse montre des dépôts d'IgG et de C3 entre les kératinocytes et sur leur surface prenant un aspect en « maille de filet » (Figure 18). L'analyse du sérum des patients démontre la présence d'IgG dirigés contre la surface des kératinocytes dont le titre est corrélé à l'activité de la maladie. Les techniques d'ELISA ou de western blot montre que ces anticorps reconnaissent la Dsg1 pour le PF et la Dsg3 pour le PV ou une double positivité dans les formes cutanéomuqueuses.



Le traitement repose sur une corticothérapie systémique à forte dose de prednisone (CORTANCYL®) de 1 à 1,5 mg/kg/jour en traitement d'attaque puis diminution progressive des doses jusqu'à l'entretien pour contrôler la maladie souvent pendant plusieurs années. Il est aussi possible d'utiliser des immunosuppresseurs comme l'azathioprine, la cyclophosphamide ou la ciclosporine dans les cas de cortico-résistance ou dans les formes les plus sévères associés aux corticoïdes (Nguyen et al. 2004). La disulone et les dermocorticoïdes comme le clobetasol (DERMOVAL®) sont une bonne alternative dans les formes peu étendues ou comme traitement des PF. Des biothérapies par déplétion des LB par RTX sont aujourd'hui utilisées pour stopper la sécrétion d'auto-anticorps pathogéniques en éliminant les LB circulants responsables de la pathologie. Le RTX a montré son efficacité dans le traitement des formes cortico-résistantes des pemphigus à court terme (Joly et al. 2007; Mouquet et al. 2008) et à long terme (Colliou et al. 2013) et est aujourd'hui, dans notre laboratoire en train

d'être évalué en première ligne de traitement du Pemphigus sur 90 patients en comparaison du traitement corticoïde de référence.

## D. Les Maladies auto-immunes bulleuses sous épidermiques

Les maladies auto-immune sous épidermiques sont multiples mais ont comme cible commune la jonction dermo-épidermique. Les pathologies majeures de ce groupe sont : la Pemphigoïde bulleuse (PB), la Pemphigoïde cicatricielle, la Pemphigoïde gravidique, la dermatose à IgA et la dermatite herpétiforme. Il sera fait une brève présentation clinique de ces dermatoses mais le développement physiopathologique, diagnostic et thérapeutique s'appliquera essentiellement sur la Pemphigoïde bulleuse sur laquelle portent une partie des travaux de cette thèse.

### 1. Clinique

La PB est la maladie majeure du groupe des MBAI sous-épidermiques et la plus fréquente de toutes les MBAI. L'âge moyen des patients atteints de PB est de 80 ans et son incidence est de 6 à 7 nouveaux cas par million d'habitants par an et monte à 150 à 330 nouveaux cas par millions d'habitants par an chez les plus de 80 ans (Schmidt and Zillikens 2013; Joly 2008; Langan et al. 2008). Sur le plan clinique, la PB est caractérisée par la présence de bulles tendues très prurigineuses localisées essentiellement au tronc et à la flexion des membres (Figure 19). Les bulles laissent ensuite place à des lésions érodées et crouteuses. Il n'y a généralement pas d'atteinte muqueuse, parfois orales mais plutôt érosives que bulleuses, et le signe de Nikolsky apparait négatif. Certaines formes de PB sont non bulleuses, dans ce cas les lésions sont très prurigineuses et non spécifiques comme des papules érythémateuses et des plaques urticariennes.



La Pemphigoïde cicatricielle est une maladie plus inflammatoire chronique sous-épithéliale. Elle touche plus souvent les personnes jeunes et son incidence est estimée à 1,6 par million d'habitants par an. Cette pathologie est caractérisée par l'apparition de bulles surtout sur les muqueuses mais parfois aussi sur la peau normale, elle touche principalement les muqueuses buccales et oculaires. Cette pathologie peut évoluer jusqu'à la cécité du patient lors d'atteintes oculaires trop importantes, mais aussi la constriction des voies respiratoires, une dysphagie et des problèmes urinaires et sexuels très handicapant. Les patients atteints de PB ont un taux de mortalité assez élevé de l'ordre de 30 à 40% par an. Les malades décèdent principalement de complications infectieuses ou cardiovasculaires liées aux portes d'entrée infectieuses que sont les lésions et aux nombreux traitements immunosuppresseurs.

Comme son nom l'indique, la Pemphigoïde gravidique touche les femmes enceintes, elle présente de nombreuses similitudes avec la PB classique. L'incidence est estimée à 0,5 cas par million d'habitants par an. La clinique semble se déclencher plutôt en fin de grossesse avec une apparition brutale de nombreuses papules urticariennes très prurigineuses et des bulles siégeant sur l'abdomen et le tronc. 5 à 10% des nouveaux né de mère ayant cette pathologie développent des atteintes cutanées le plus souvent transitoires et auto-résolutives rapidement.

La dermatose à IgA est la MBAI la plus courante chez l'enfant avec un pic de prévalence à 4-5 ans et devient assez rare chez l'adulte. Les lésions sont de type cloques tendues agencées en collier de perles et sont caractéristiques. Il existe un vaste prurit général et les lésions siègent le plus souvent sur le tronc, les membres, la zone sacro-illiaque et les grands plis du corps peuvent également être affectés. Les lésions peuvent être muqueuses en particulier buccales et pharyngiennes. Le déclenchement est souvent spontané mais des cas induits à la vancomycine ont été rapportés.

La dermatite herpétiforme est une maladie qui peut se déclencher à tout âge, et touche 2 fois plus les hommes que les femmes. L'incidence est de 0,4 à 2,6 cas pour 100000 habitants par an. Typiquement, les lésions sont de grandes papules ou vésicules de 1 à 3 mm (d'où le nom herpétiforme) très prurigineuses. Les lésions guérissent avec une lichénification et des problèmes de pigmentation. Les lésions siègent volontiers sur les faces d'extension des extrémités (coudes, genoux) mais aussi sur le dos. La dermatite herpétiforme peut se développer en entéropathie et est étroitement liée à la sensibilité au gluten. Elle atteint jusqu'à 10% des patients atteints de maladie coeliaque.

## 2. Physiopathologie

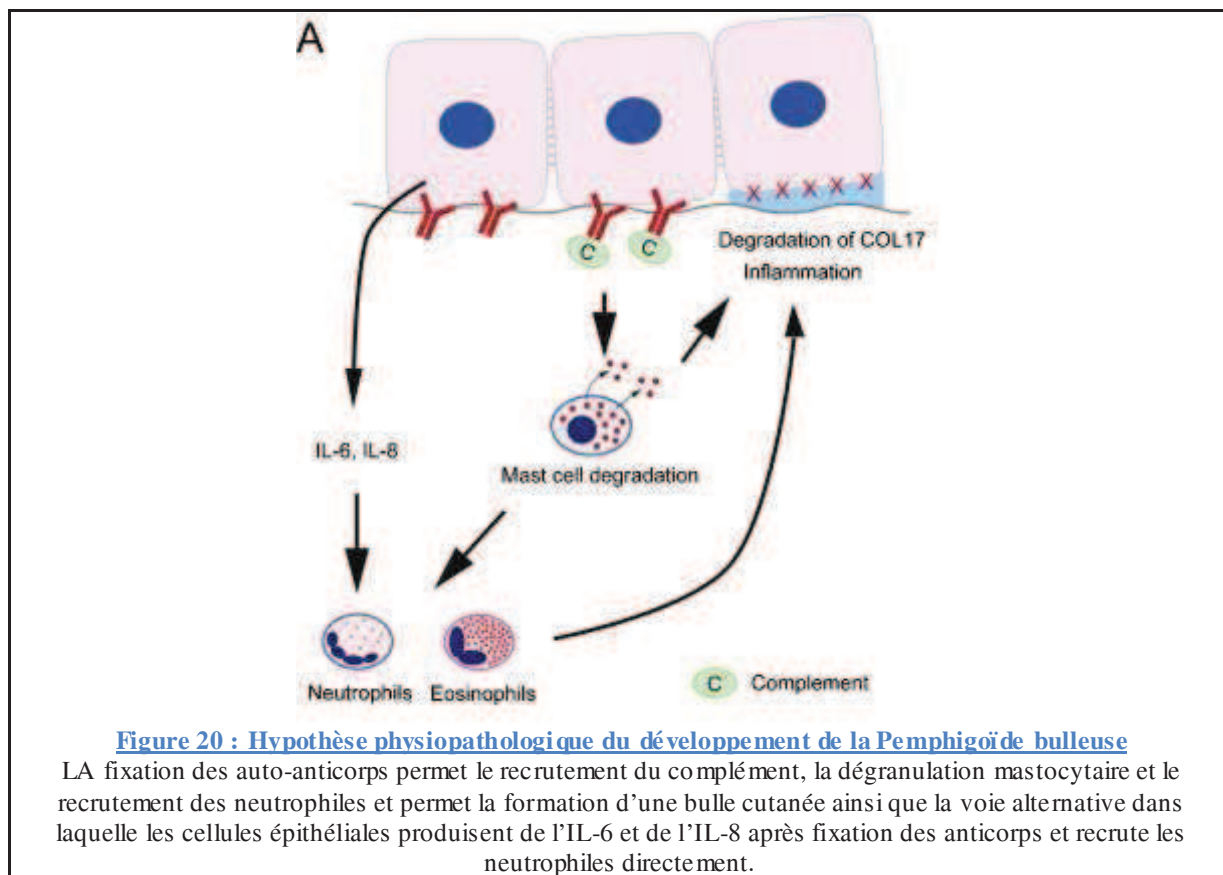
La physiopathologie de la PB repose sur la fixation par des auto-anticorps de différentes cibles antigéniques composant la JDE et notamment BP180 (Collagène XVII ou BPAG2) et BP230 (BPAG1). Lors de mutations dans les séquences codantes de ces molécules, les patients développent les formes génétiques d'épidermolyses bulleuses. Il a été mis en évidence des LB et des LT spécifiques de BP180 et BP230 sous tendant une collaboration immunologique dans le développement de l'auto-immunité. BP180 est l'antigène majeur de la PB, c'est une molécule transmembranaire avec une partie intracytoplasmique de liaison au cytosquelette kératinocytaire et une partie extracellulaire composée de la juxtaposition de plusieurs domaines collagène et du domaine non collagène



NC16A. Il a été démontré que les anticorps d'isotype IgG et IgE responsables de la pathogénicité fixent ce domaine NC16A (Zillikens et al. 1997; Fairley, Fu, and Giudice 2005). Pour valider la pathogénicité de la fixation d'Ig au domaine NC16A, des souris transgéniques exprimant un collagène XVII humain ont reçu par transfert passif des IgG anti-NC16A de patients atteints de PB et cette injection provoque un décollement épidermique (Nishie et al. 2007). Des auto-anticorps dirigés contre les éléments intracellulaires de BP180 ainsi que BP230 (entièrement intracellulaire) mettent en évidence un mécanisme de diffusion de l'auto-immunité « epitope spreading ». En effet, il a été démontré un changement de l'immunogénicité du domaine NC16A après clivage par des acteurs immunitaires secondaires (les éosinophiles et le complément) qui renforce la réaction anti-BP180 et accélère le phénomène d'« epitope spreading » car cela génère de nouveaux épitopes et active de nouveaux lymphocytes (Nishie et al. 2010).

La présence d'auto-anticorps dirigés contre BP180 ou d'autres éléments de la JDE ne suffisent pas à induire la formation de bulles. En effet il a été démontré dans un modèle de souris ayant reçu des anticorps de lapin anti-NC14A (même domaine que le NC16A humain) que ces anticorps fixaient la JDE, s'ensuit un recrutement et une activation du complément, une dégranulation mastocytaire d'histamine, un recrutement des neutrophiles et finalement un décollement bulleux par friction. Cette expérience ne marche pas chez des souris C5 déficiente, mastocyte déficiente ou après injection intra-péritonéale d'IL-8 qui séquestre les neutrophiles dans le péritoine prouvant ainsi l'implication du complément, des polynucléaires et des mastocytes (Liu et al. 1995; Liu et al. 1997; Chen et al. 2001). Wang et son équipe ont prouvé que le F(ab')<sub>2</sub> des auto-anticorps ne suffisait pas à induire la formation de bulles, impliquant le Fc dans le recrutement du complément. Une autre étude a démontré que seul les IgG1 mais pas les IgG4 humaines recombinantes anti-NC16A induisaient la formation de bulles chez des souris transgéniques porteuses d'un BP180 humain (Li et al. 2010). La

physiopathologie est défini comme la fixation d'IgG1 sur la JDE qui recrutent le complément et les mastocytes par leur Fc induisant le recrutement des neutrophiles et enfin permettre la formation de la bulle sous épidermique (Figure 20).



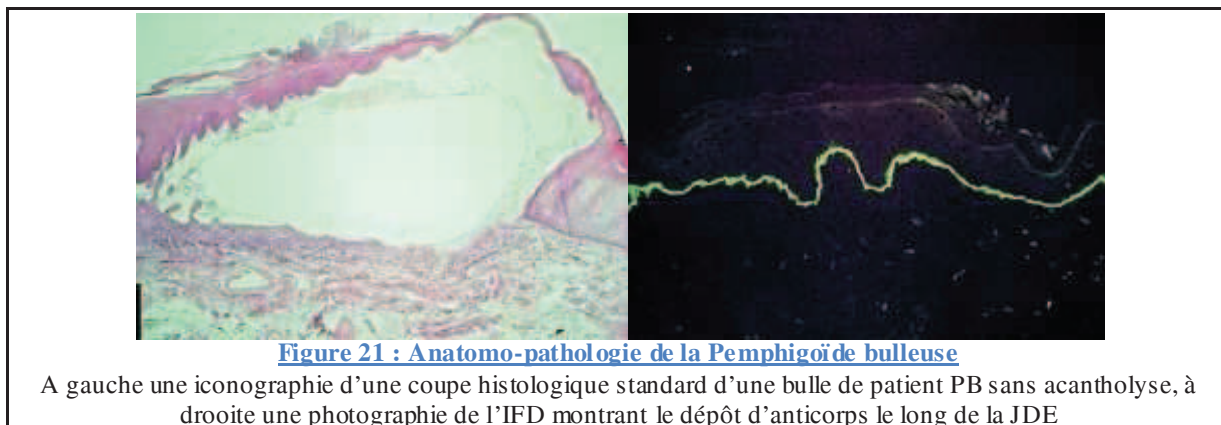
Cependant, il a été recensé un cas clinique de PB chez un patient déficient en C4 du complément (Shiraishi et al. 1991) alors que les souris déficientes en C4 sont résistantes aux PB induites par transfert d'anticorps (Nelson et al. 2006). De plus, il est fréquemment retrouvé des IgG4 chez les patients atteints de PB et ces IgG4 sont capables d'induire une séparation dermo-épidermique sur des cryosections *in vitro*. Ces découvertes suggèrent l'existence d'une voie de formation des bulles qui serait indépendante du complément et induite par des IgG4. En effet, les cellules épithéliales sont capables de sécréter de l'IL-8 après fixation des auto-anticorps à la JDE dans des modèles de culture de kératinocytes *in vitro*, l'IL-8 peut recruter directement les neutrophiles sans le complément (Schmidt, Reimer, et al. 2000). Enfin un mécanisme d'internalisation des complexes immuns de BP180 et ses

anticorps peut être à l'origine de la formation d'une bulle par perte de la BP180 par micropinocytose (Hiroyasu et al. 2013).

Le problème des modèles de PB existant est qu'il n'est pas retrouvé d'infiltrat d'éosinophiles alors qu'il est commun chez les patients atteints de PB. De plus, il est retrouvé des IgE chez beaucoup de patients, et ces IgE se lient à la JDE dans 41% des cas (Yayli et al. 2011). Une étude a montré que les IgE de patients PB peuvent induire le développement d'un érythème urticarien et une séparation dermo-épidermique associée au recrutement des neutrophiles et des éosinophiles sur une peau humaine greffée à une souris *nude* (Fairley et al. 2007). De plus, des études récentes ont montré que des IgE de patients PB peuvent être internalisés par des kératinocytes en culture, induire la sécrétion d'IL-8 et la déplétion en hémidesmosomes comme observée avec des IgG mais de façon FcR indépendante (Messingham et al. 2011). Ces études prouvent l'implication physiopathologique des IgE anti-BP180 dans la PB.

### 3. Diagnostic et traitement

Le diagnostic de la PB se fait sur plusieurs éléments. D'abord clinique, la présence de bulles tendues à contenu clair chez un patient âgé. Le signe de Nikolsky est négatif. Les résultats des investigations biologiques montrent une hyperéosinophilie que l'on ne retrouve pas dans le pemphigus. L'histologie standard montre des bulles sous épidermiques contenant des éosinophiles caractéristiques de la PB, sans acantholyse (contrairement au pemphigus) ni nécrose des kératinocytes et souvent associé à un infiltrat inflammatoire polymorphe. Les résultats d'IFD présentent un dépôt linéaire d'IgG et de C3 le long de la membrane basale de la JDE (Figure 21). L'IFI standard expose des anticorps anti-membrane basale d'isotype IgG dans 80% des cas et leur taux n'est ni corrélé à la sévérité ni à l'étendue de la maladie. L'IFI sur peau clivée montre que les anticorps se fixent au toit de la zone de clivage soit la JDE.



Les techniques ELISA montrent une positivité de la fixation d'auto-anticorps sur BP180 et BP230. Le traitement comporte des mesures d'hygiène liées à la présence des bulles : bains antiseptiques, hydratation et nutrition de la peau compensant les pertes hydro-électrolytiques. Le traitement immunitaire classique de la PB repose sur une corticothérapie générale à base de prednisone (CORTANCYL®) à la dose de 0,5 à 1 mg/kg/jour pour la dose d'attaque, suivi d'une dégression progressive jusqu'aux doses d'entretien qui dépendent du contrôle des signes cliniques et des effets secondaires d'une corticothérapie aussi forte chez des personnes âgées. De récentes études ont démontré la même efficacité sur les bulles avec une corticothérapie locale à base de clobetasol (DERMOVAL®) et une meilleure tolérance (Joly et al. 2002). Le traitement d'attaque est poursuivi 15 jours, la dose est ensuite réduite par pallier jusqu'aux doses d'entretien suivi pendant 6 à 12 mois. D'autres traitements immunosuppresseurs peuvent être envisagés en cas de résistance ou de contre-indication à la corticothérapie comme l'azathioprine ou le micophénolate mofetil. De nouveaux traitements immunosuppresseurs issus des biothérapies sont à l'étude pour le traitement des formes cortico-résistantes de la PB, notamment le RTX qui a déjà fait ses preuves pour traiter le pemphigus dans ces formes cortico-résistantes et fait ici l'objet d'une partie du travail de cette thèse.

### III. Objectifs de Thèse

Mon projet de thèse porte sur l'analyse des éléments de contrôle de l'auto-immunité dans les maladies auto-immunes bulleuses.

Nous avons mis en place un essai clinique multicentrique portant sur le traitement par RTX de patients atteints de PB en rechute et cortico-résistant. Nous avons reçus des bilans cliniques ainsi que des prélèvements biologiques sur une période de 2 ans qui nous ont permis d'effectuer un suivi clinique visant à évaluer l'efficacité et la tolérance du RTX dans le traitement de la PB réfractaire ; mais aussi de suivre un certain nombre d'éléments biologiques indicateurs de l'efficacité du traitement par RTX, de son impact sur le système immunitaire et donc sur l'auto-immunité dont souffre ces patients. Sur le plan biologique, les taux des anticorps anti-BP180 et anti-BP230 ont été mesurées par ELISA, et les différentes sous-populations de LB ont été analysées par cytométrie de flux. Des techniques de culture et d'activation *in vitro* nous ont permis de suivre le nombre de LB sécréteur d'IL-10 chez nos patients. Nous disposons, grâce à l'équipe allemande de Mickael Hertl, d'un peptide recombinant NC16A, domaine immuno-dominant de la PB, avec une queue poly-Histidine nous permettant de suivre la fréquence de la population de B spécifique de la BP180 tout au long de l'étude mais aussi et surtout de les trier une par une. L'objectif est de séquencer leurs BCR anti-BP180 et ainsi avoir une idée du répertoire anti-BP180 des patients. En parallèle de cette étude du répertoire auto-immun restreint, il a été fait une analyse du répertoire B global par immunoscope. Enfin, nous avons accès à la technologie de Fluidigm® Biomark® à l'institut Pasteur, ce qui nous permet d'identifier des profils de sécrétion cytokinique à l'échelle de la cellule. Ces techniques nous permettent de suivre l'activité des LB avant et après traitement chez des patients bons ou mauvais répondeurs au traitement, ainsi que de dégager des éléments biologiques différenciant les patients en rémission complète ou non qui pourraient expliquer peut être le mécanisme des rechutes et le retour éventuel de l'auto-

immunité. L'analyse du répertoire global et BP180 spécifique nous permet tout d'abord de mettre en évidence un répertoire auto-immun restreint dans son utilisation des gènes V, D et J ainsi que d'apprécier l'impact du RTX sur celui-ci ainsi que sur le répertoire lymphocytaire B global. L'analyse du profil de sécrétion cytokinique « one cell » nous permet d'identifier l'état d'activation des cellules BP180 spécifiques et leur fonctionnalité avant et après RTX. Tous ces éléments nous permettront d'émettre des hypothèses physiopathologiques sur les mécanismes de déclenchement de l'auto-immunité, sur l'impact du RTX et la disparition des LB dans les MAI, d'identifier et d'analyser un répertoire auto-immun restreint et de mettre en évidence des éléments expliquant les rechutes chez certains patients.

Les MBAI représentent un groupe de maladies dont la physiopathologie est caractéristique des maladies spécifiques d'organes à auto-immunité humorale. Le traitement de ces maladies par des médicaments éliminant les LB est bénéfique pour les patients. Cependant les mécanismes de déclenchement de l'auto-immunité restent une énigme tout autant que les mécanismes de contrôle de la maladie après traitement qui expliqueraient pourquoi certains patients rechutent et d'autres pas. L'impact de ces traitements sur la régénération des LB et le répertoire auto-immun est aussi une clé de la compréhension des mécanismes d'action des nouvelles thérapies.

# Résultats

---

## I. Introduction aux résultats des travaux sur la Pemphigoïde Bulleuse

La première partie des résultats concernent donc les travaux portant sur la Pemphigoïde Bulleuse (PB). Ces travaux ont permis la rédaction d'un article scientifique présenté ci-après. Nous avons travaillé sur des prélèvements sanguins provenant de patients atteints de PB récalcitrante au traitement par corticoïdes. Dix-huit patients ont été recrutés dans un essai clinique multicentrique, non randomisé, visant à évaluer la sécurité et l'efficacité du rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20 commercialisé par Roche® sous la dénomination commerciale Mabthera®) en un seul cycle de traitement de la PB. Ces patients ont reçu 2 doses (à J0 et à J7) de 1000mg de RTX et ont été suivis cliniquement et biologiquement pendant 2 ans. Le suivi clinique a été effectué dans les différents centres de références dermatologiques de CHU français. Le suivi biologique a consisté en un dosage des concentrations sanguines des auto-anticorps anti-BP180 et –BP230, un phénotypage des sous-populations circulantes de LB, une analyse du répertoire global des LB aux différentes dates d'entretien durant les 2 ans. De plus, nous avons à notre disposition un peptide recombinant de l'immuno-domaine NC16A de la BP180 à laquelle est greffée une queue peptidique de 6 histidines. Ce peptide nous a permis de marquer les lymphocytes B spécifiques de la BP180, de les suivre en cytométrie et de les trier individuellement. La concentration des lymphocytes B auto-réactifs spécifiques de la PB a pu être suivie chez nos patients. Le tri de ces cellules nous a aussi permis de séquencer la partie variable de la chaîne lourde de leur BCR et ainsi analyser l'utilisation des gènes VH et mettre en évidence des motifs de séquences redondants. De plus, nous avons effectué des analyses d'expression des gènes de cytokines dans le but de mettre en évidence des différences fonctionnelles entre les LB auto-immuns des patients avant

et après traitement expliquant les rechutes de certains. Ces analyses d'expressions géniques «one cell » ont été effectuées grâce à la technologie Biomark Fluidigm. Il s'agit d'un équipement associant une machine de qPCR composée d'un bloc et d'une caméra CCD pour les analyses de qPCR, ainsi que d'une plaque permettant des réactions qPCR haut débit en croisant jusqu'à 96 prélèvements d'ARN à 96 paires d'amorces, générant ainsi 9216 résultats de qPCR par plaques. La plaque de qPCR (Figure 22) dispose de toute une série de micro-canaux capillaires reliant des nano-chambres de qPCR dans lesquelles vont se répartir, grâce à un jeu de pressions différentielles, les prélèvements ainsi que les amorces. La plaque chargée est ensuite prête à subir les cycles de PCR suivant le type d'amorces utilisé dans la machine Biomark.



L'intérêt de l'utilisation de cette technologie réside dans la faible quantité de matériel ARN nécessaire à l'analyse. En effet, l'ARN d'une seule cellule est analysable pour l'expression de 96 gènes. Cependant, cet ARN doit subir une rétro-transcription suivie d'une pré-amplification pour être dans les conditions optimales d'analyse. Cette pré-amplification



consiste à faire subir à l'ADNc des cellules d'intérêt, 20 cycles de PCR en présence d'un mix contenant toutes les amorces. Cette étape permet d'amplifier les petites quantités d'ADNc mais reste quantitative pour la suite de l'analyse. De plus, cette pré-amplification permet l'analyse des cellules directement après leur isolement sans passer par des étapes d'activation *ex vivo* et reflète ainsi l'état des cellules dans l'organisme du patient. Pour notre étude, nous avons choisi les gènes de différentes cytokines exprimées par les LB dans la littérature pour analyser leurs profils d'expression cytokinique corrélés à l'état clinique des patients.

Les travaux ont permis de mettre en évidence l'efficacité clinique du RTX puisque les signes cliniques de la pathologie ont disparus après le traitement. Malgré 5 morts durant la première année non liées au traitement (avis pharmacovigilance), les 9 autres patients ont tous terminés l'essai clinique en rémission complète, bien que 7 patients soient sous traitement corticoïde locale car ils ont rechuté durant l'étude. Le suivi immunologique montre une baisse rapide et durable du taux d'auto-anticorps IgG anti-BP180 et -BP230, ainsi qu'une déplétion des LB durant 9 à 12 mois. Les analyses phénotypiques B lors du retour de l'immunité humorale démontrent une modification de la balance LB naïfs / LB mémoires en faveur des naïfs même à 2 ans du traitement. Le retour des LB est caractérisé par une augmentation de la population B transitionnelle sans pour autant augmenter le nombre de B sécrétant de l'IL-10. De plus, les analyses de répertoire montrent une diversité normale dans l'utilisation des gènes VH par les LB après traitement chez tous les patients. Les LB auto-immun spécifiques de la BP180 ont été triés et analysés à l'échelle unicellulaire afin de séquencer le CDR3 de la chaîne lourde de leur BCR, et d'analyser leurs profils d'expression cytokinique. Les résultats démontrent un changement de profil d'utilisation des gènes VH par les cellules auto-immunes après traitement, un blocage du « switch isotypique » des LB IgM+ BP180 spécifiques en IgG+ pathogéniques. Enfin les analyses d'expression cytokinique montrent une fréquence d'expression de l'IL-15, de l'IL-6, de TRAIL et de TNF plus importantes avant traitement et

l'apparition de LB IgM+ BP180 spécifiques exprimant les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-1RA seulement chez les patients en rémission complète, n'ayant pas rechutés.

Cette étude rapporte les résultats cliniques concernant l'efficacité du RTX en traitement de la PB récalcitrante mais également de nouvelles données biologiques sur le contrôle homéostatique du compartiment lymphocytaire B global et auto-immun en démontrant la baisse du contingent effecteur de LB IgG+ pathogéniques au profit de LB auto-immuns de type régulateurs.

## II. Article en préparation

# **Bullous Pemphigoid patients treated with Rituximab reveal BP180 specific B cell autoimmune plasticity**

### **Authors:**

Berkani N<sup>1</sup>, Joly P<sup>1,2</sup>, Colliou N<sup>1</sup>, Lim A<sup>3</sup>, Larbi A<sup>4</sup>, Riou G<sup>1</sup>, Caillot F<sup>1</sup>, Bernard P<sup>5</sup>, Bedane C<sup>6</sup>, Delaporte E<sup>7</sup>, Lok C<sup>8</sup>, Donmartin A<sup>9</sup>, Hertl M<sup>10</sup>, Calbo S<sup>1</sup> and Musette P<sup>1,2</sup>

### **Affiliations:**

1 INSERM U905, Normandie University, Rouen, France.

2 Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Centre de référence des maladies bulleuses autoimmunes, Normandie University, Rouen, France.

3 Plateforme d'Immunoscope, Institut Pasteur, Paris, France.

4 Singapore Immunology Network (SIgN), Agency for Science, Technology and Research (A\*STAR), Singapore.

5 Department of Dermatology, Reims University Hospital, Reims, France

6 Department of Dermatology, Limoges University Hospital, Limoges, France

7 Department of Dermatology, Lille University Hospital, Lille, France.

8 Department of Dermatology, Amiens University Hospital, Amiens, France.

9 Department of Dermatology, Caen University Hospital, Caen, France.

10 Department of Dermatology and Allergology, Philipps University of Marburg, Marburg, Germany.

### **One Sentence Summary:**

Patients with recalcitrant Bullous Pemphigoid treated with Rituximab reveal a shift in B-Cell Receptor gene usage and cytokine expression by autoimmune B cells.

**Abstract:**

Bullous Pemphigoid is the most common auto-immune bullous skin disease. It is characterized by the production of auto-antibodies directed against proteins of the hemidesmosome (BP180 and BP230). Rituximab has successfully treated other auto-antibody immune diseases, thus we decided to assess the efficacy of a single cycle of Rituximab in 18 patients with severe type of Bullous Pemphigoid. An immunological evaluation was done to understand mechanisms of auto-immune response after treatment. After a 2-year follow-up, 5 patients died, 3 withdrew from the study 2 patients were in complete remission off therapy and 7 patients in complete remission on minimal therapy. The 1 and 2-year relapse rates were 29.4% (95% CI: 10.3%-55.9%) and 41.2%, (95% CI: 18.4%-67.1%). Lymphocyte phenotype analysis confirmed B-cell depletion which lasted for 9 to 12 months. Serum anti-BP180 - antibody ELISA values and circulating BP180 specific-B cells frequency decreased dramatically after treatment, which paralleled the improvement of skin lesions. We observed the reappearance of a polyclonal IgM repertoire and changes in the rearrangement of B-cell receptor genes in BP180-specific circulating B cells after treatment. Moreover, cytokine gene expression analysis showed decrease in frequency of BP180-specific B cells expressing IL-15, IL-6 and TNF $\alpha$  and production of new BP180-specific IgM+ B cells expressing IL-10 and IL-1RA after treatment in patients in complete remission. This study reveals the plasticity of BP180 specific auto immune B cells after B cell depletion.

## **Introduction**

Bullous Pemphigoid (BP) is the most frequent sub-epidermal auto-immune bullous skin disease with an incidence between 7 and 21 new cases per million per year in the whole population and incidence rates estimated at 150 new cases per million per year in people over 80 years old (Joly 2008; Langan et al. 2008; Schmidt and Zillikens 2013). BP is characterized by the production of auto-antibodies directed against 2 proteins component of the hemi-desmosome: BP230 (BPAG1) and BP180 (BPAG2). BP180 is the major antigen of BP. Patient' serum IgG recognize the C-Terminal extracellular non collagen 16A (NC16A) domain of BP180 (Zillikens et al. 1997). The binding of antibodies on the NC16A domain leads to the activation of complement, and the recruitment and activation of eosinophils and mastocytes, that disrupt the basement membrane zone (BMZ), and induces bullous formation in the skin (Liu et al. 1995; Liu et al. 1997; Chen et al. 2001). Disease activity generally correlates with serum anti-BP180 antibody levels (Schmidt, Obe, et al. 2000) and their measure by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are used for the diagnosis of BP (Roussel et al. 2011). The mostly validated treatment for BP is topical steroids (Joly et al. 2002; Joly et al. 2011). Other immunosuppressive drugs such as mycophenolate mophetil or azathioprine can be used for recalcitrant types of BP but are poorly tolerated in elderly BP patients (Schmidt and Zillikens 2011).

Rituximab (RTX) showed efficacy on auto-immunes diseases and particularly on pemphigus (Joly et al. 2007) and also BP patients (Kasperkiewicz et al. 2011; Shetty and Ahmed 2013; Ahmed et al. 2016). These studies report a high rate of complete response but there are still relapse. That's why we decided to assess the efficacy of a single cycle of rituximab as treatment for relapsing cortico-resistant forms of BP on 18 patients followed for 2 years. An immunological evaluation was done to measure the impact of Rituximab on B cell

subpopulations, to follow auto-immune response after treatment and underline mechanism of tolerance disrupt and relapse.

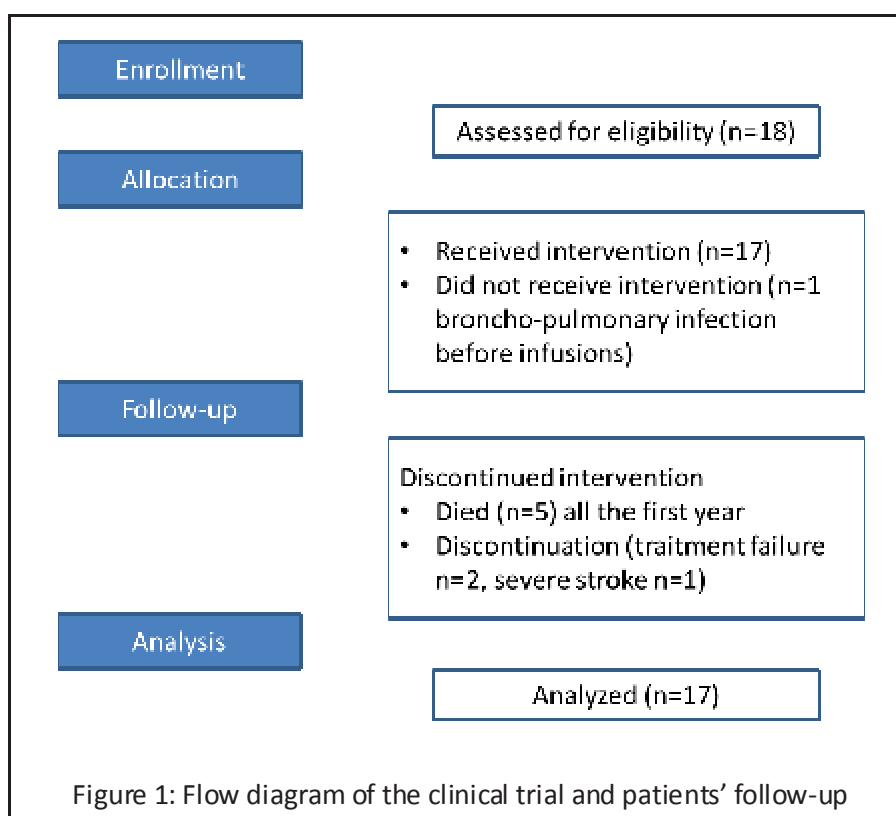
Therefore B cells phenotypes and repertoires were analyzed, as well as auto-antibody blood titers along the trial. A Poly-Histidine tagged recombinant NC16A domain peptide allowed measurement of BP180-specific B cells frequency, to analyze CDR3 repertoire changes and cytokine gene expression profiles, before and after treatment, at a single cell level. Autoimmune B cells were analyzed after single cell sorting without *ex-vivo* stimulation meaning that we showed a snap shot of *in vivo* state of auto-immune B cells. Functionality and B cell receptors of BP180-specific B cells were analyzed to underline differences between responders and relapsing patients that could explain auto-immune selection and tolerance disrupt. This study provides for the first time a single cell view of cytokine gene expression profiling in autoimmune B cells in the context of BP patients treated by RTX.

## **Results**

### **Subhead 1: Clinical outcome**

Eighteen patients with recalcitrant and / or relapsing types of BP were included and treated with a single cycle of 2 g of rituximab. A flow diagram of the clinical trial is shown in Figure 1 and patients' characteristics are described in supplementary Table 1. The mean age of patients was  $77.7 \pm 10.9$  years. The mean number of daily new blisters at time of inclusion was  $31.9 \pm 43.3$ . One patient who had a pulmonary infection the day before rituximab treatment did not receive the rituximab infusions and was excluded from the analysis. All patients achieved disease control after 2 infusions of 1 g of rituximab and topical applications of clobetasol propionate for the first two months. Two patients withdrew from the study at day 270 and 540 for treatment failure, and a third patient for a stroke which occurred at day of RTX infusion (severe stroke). In addition to this stroke, severe treatment adverse events included five deaths which occurred during the first year of the trial (failure to thrive

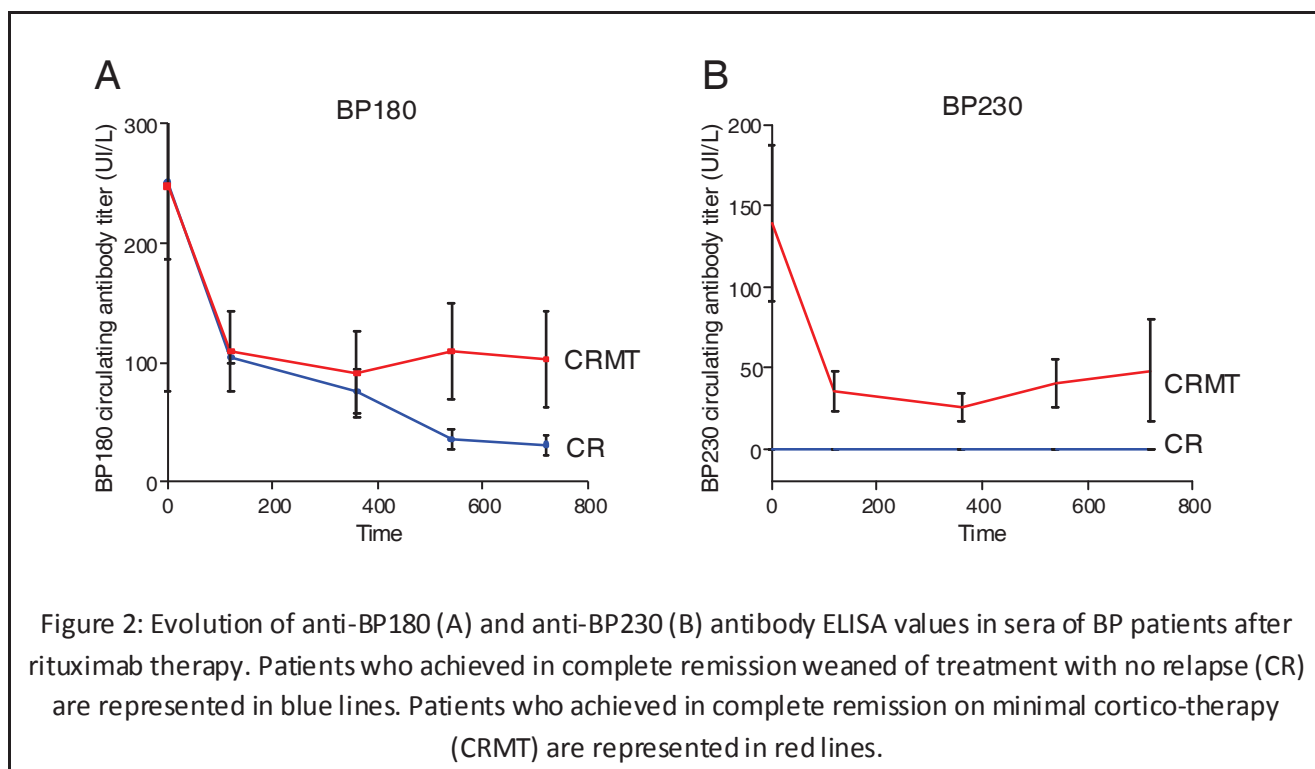
syndrome n=2; acute respiratory failure, n=1; cardiac failure, n=1; gastro-intestinal bleeding, n=1), and two pneumoniae which occurred on day 10 and day 270. Out of the 9 patients who completed the study, 2 patients were in Complete Remission (CR) off-therapy, and 7 were in CR still receiving a prednisone dose < 10 mg/day (CR on minimal therapy). The 1- and 2-year relapse rates were 29.4% (95% CI: 10.3%-55.9%) and 41.2%, (95% CI: 18.4%-67.1%) respectively.



**Subhead 2: Auto-antibody follow-up**

We first investigated the evolution of serum anti-BP180 and anti-BP230 auto-antibodies following rituximab treatment (Figure 2). Before treatment, 15 and 5 patients had anti-BP180 and anti-BP230 auto-antibodies, respectively. During the 6 month period after rituximab infusions, all but one patient had a major decrease of anti-BP180 and anti-BP230 auto-antibodies from mean BP180 and BP230 ELISA values of  $248.5 \pm 54.9$  UI/L and  $138.8 \pm 48.2$  UI/L at baseline to  $86.2 \pm 23.4$  UI/L and  $37.0 \pm 18.2$  UI/L at 6 months. However, a re-increase of anti-BP180 and/or anti-BP230 antibody ELISA values was observed from 6

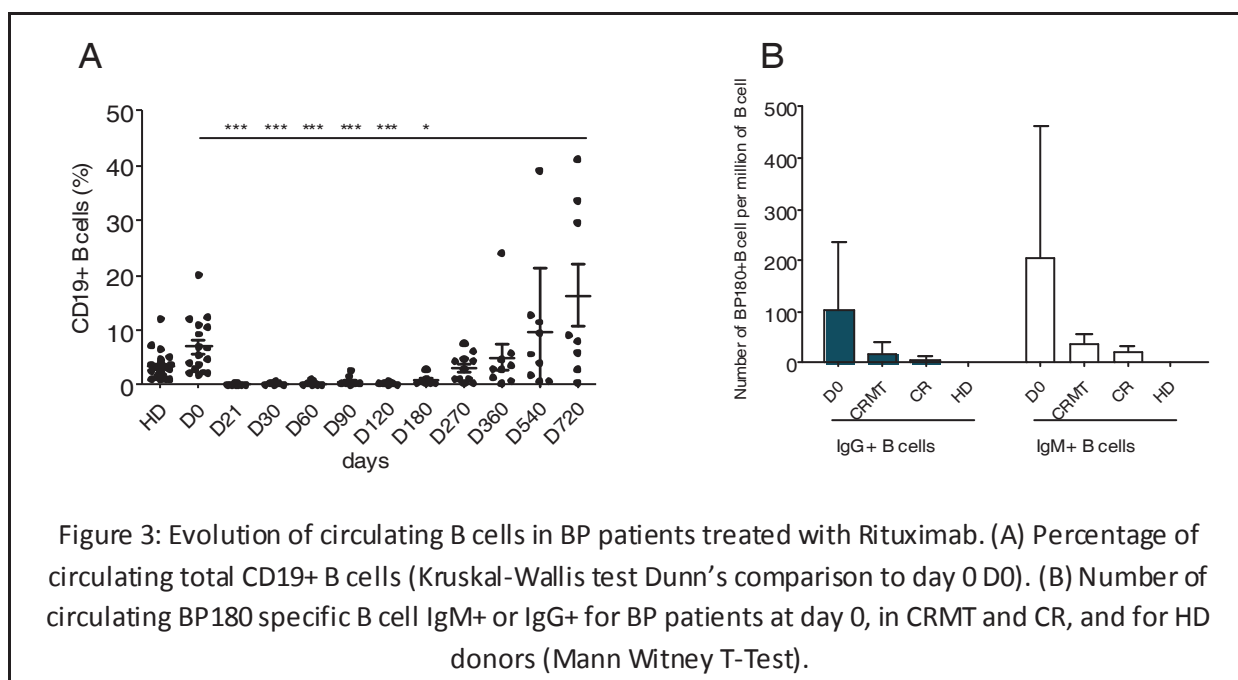
months to the end of the study in most relapsing patients as the mean was  $102.9 \pm 39.7$  UI/L for anti-BP180 auto-antibodies and  $39.0 \pm 26.5$  UI/L for anti-BP230 (Figure 2); whereas the two patients who achieved CR off therapy and did not relapse, had a rapid, marked and long lasting decrease of anti-BP180 antibodies up to 2 years after treatment with anti-BP180 antibody titer at  $31 \pm 9$  UI/L (Figure 2B).



### Subhead 3: Phenotypic analysis

To understand RTX impact on humoral compartment, phenotypic analysis of B cell subpopulations was performed throughout the trial by flow cytometry. A major depletion in total B cell population was observed for 9 to 12 months in most patients after RTX infusion (Figure 3A), even if two patients showed persistent depletion 1 year after RTX treatment.





B cell subpopulations were characterized and RTX induced long-lasting reversal of the balance between naive and memory circulating-B-lymphocytes. Indeed, the mean percentage of naive B cells in patients at D0 ( $63.04 \pm 6.01\%$ ) was significantly lower than 2 years after RTX treatment ( $84.85 \pm 5.317\%$ , p-value = 0.0313; Figure S1). The mean percentage of memory B cells at D0 was  $26.94 \pm 6.01\%$  and decreased at 2 years to  $15.15 \pm 5.317\%$  (p = 0.0313, Figure S1). The return of B cells after treatment was characterized by the emergence of transitional B cells (6.8-fold increase between D0 and D270), that remained at a high level 2 years after treatment (3.4-fold increase between D0 and D720, p-value = 0.0313, Figure S1). However, on performance of flow cytometry we did not observe a re-emergence of high numbers of IL-10-producing regulatory-B-cells after *in vitro* stimulation of patients' B cells, since the level of regulatory B cells stayed the same before and after RTX treatment (Figure S1). The frequency of BP180 specific B cells was determined by flow cytometry, with a HIS tagged recombinant immunodominant NC16A peptide (Figure S2 and Figure 3B). The mean number of BP180 specific B cells per million CD19+ B cells before treatment was  $205.9 \pm 257.2$  for IgM+ B cells and  $102.9 \pm 132.3$  for IgG+ B cells. RTX induced a long-lasting and large decrease in BP180 specific B cells with a 5-fold decrease for IgM+ B cells and IgG+ B

cells in all patients. Interestingly, IgM<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> BP180 specific B cells were detectable in CRMT patients ( $21.43 \pm 21.16$  per million B cells for IgG and  $37.57 \pm 21.32$  for IgM) but also in CR patients ( $3.33 \pm 5.774$  per million B cells for IgG and  $17.67 \pm 19.66$  for IgM), especially for IgM<sup>+</sup> BP180 specific B cells for CR patients (Figure 3B). Of note, CRMT patients had a 6.4-fold increase in IgG<sup>+</sup> BP180 specific B cells compared to CR patients (p-value = 0.193). Notably, the frequency of BP180 specific B cells in HD was around 0.05%, mainly IgM<sup>+</sup>. Therefore, RTX induced a long-lasting depletion of B cells, a modification of balance between memory and naive B cells after treatment, even if BP180 specific B cells reappeared in cured patients.

#### **Subhead 4: B cell repertoire**

Patients achieved CR with or without minimal treatment even if BP180 specific B cells were still detected in blood. Next, to further understand autoimmune selection mechanism and RTX effects on B cell compartment, we investigated B cell repertoire. Global circulating IgG<sup>+</sup> and IgM<sup>+</sup> B cell repertoire was analyzed in four patients before treatment and four patients after treatment, and in 2 HD. Immunoscopes of patients before RTX showed a restricted repertoire with oligoclonal bias on IgM<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> B cells (Figure S3). After RTX, patients' B cells recovered a Gaussian polyclonal normal repertoire on IgM. Two patients in CRMT at the end of the trial showed redundant pics in IgG repertoires between D0 and D720 (VH3a for BP07 and VH3b for BP08). After showing the reminiscence of BP180 B cells in patients after treatment, we focused our study on the repertoire of BP180 specific autoimmune cells; and more particularly on BCR VH gene usage and CDR3 composition before and after treatment. BP180 specific B cells were individually sorted and the CDR3 of their heavy chain were sequenced and analyzed for VH usage and analysis of redundant motifs. Before RTX, BP180<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> B cells showed significant use of the VH5 gene family ( $37.9 \pm 11.9\%$ ) compared to IgM<sup>+</sup> B cells after RTX treatment or normal repertoire ( $6.1 \pm 8.3\%$  and  $0.4\% \pm 0.4\%$  respectively p-value < 0.0001, Figure 4A). BP180<sup>+</sup> IgG<sup>+</sup> B cells

preferentially used VH1 ( $40 \pm 15.5\%$ ) and VH5 gene family ( $32.5 \pm 14.8\%$ ) compared to IgG normal repertoire ( $1.7 \pm 1.6\%$  and  $0.7 \pm 0.6\%$  respectively,  $p$ -value  $< 0.0001$  for both, Figure 4B) and less VH3 gene family ( $76.9 \pm 5.3\%$  for normal IgG repertoire and  $17.1 \pm 11.8\%$  for BP180 specific IgG+ repertoire,  $p$ -value  $< 0.0001$ ). After RTX, only IgM+ BP180 specific B cells were analyzed since we obtained an insufficient number of IgG sequences after RTX treatment, due to the lower frequency of BP180 specific IgG+ B cells. IgM+ BP180 specific B cell repertoire after treatment showed normal distribution of all VH families for their heavy chain BCR (Figure 4A). The amino-acid composition of IgG+ BP180 specific CDR3 before RTX treatment showed redundant motifs and particularly the use of a Glycine in position 114 (Kabat numbering) for  $65 \pm 15.1\%$  of sequences (Figure 4C). After treatment, patients recovered a Gaussian polyclonal global repertoire and RTX impacted BP180 specific B cell repertoire demonstrated by a change in VH usage. Analysis of the CDR3 of the BCR heavy chain of BP180 specific IgG+ B cells revealed a redundant motif in amino-acid composition.

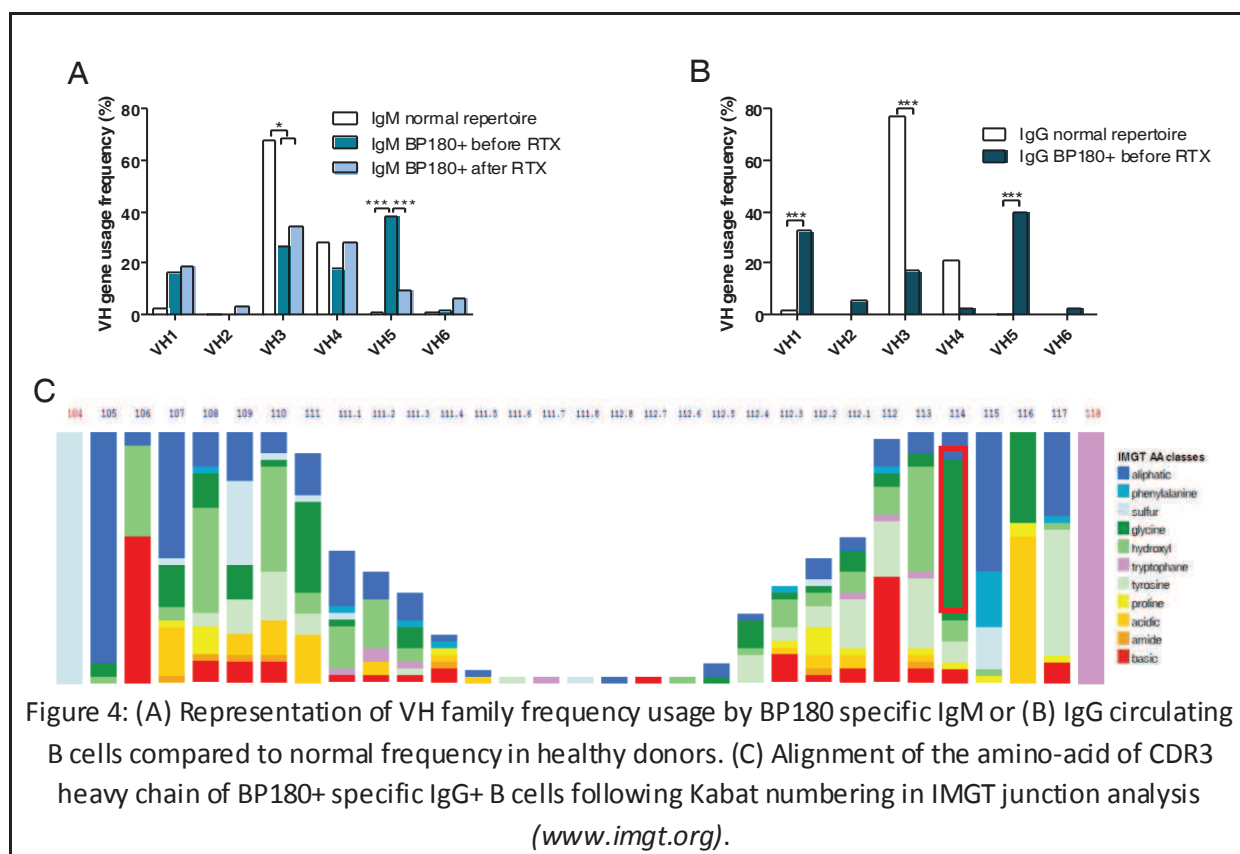


Figure 4: (A) Representation of VH family frequency usage by BP180 specific IgM or (B) IgG circulating B cells compared to normal frequency in healthy donors. (C) Alignment of the amino-acid of CDR3 heavy chain of BP180+ specific IgG+ B cells following Kabat numbering in IMGT junction analysis ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)).

**Subhead 5: cytokine secretion profile of BP180 specific B cells**

For fuller understanding of the role of auto-reactive B cell population, we used high throughput qPCR to analyze the expression of 25 cytokine genes and 5 housekeeping genes (Table S1) in autoimmune and normal B cells. Cytokine genes were selected since, according to the literature, they are secreted by human B cells. We analyzed a total of 383 single B cells including 224 BP180 specific B cells. First of all, ten cytokines were found unexpressed by single B cells including IL-2, IL-5, IL-9, IL-12p40, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-27p28 and TGFb2. However, positive control wells containing 100 CD19+ cells showed detectable expression levels of all tested cytokine genes. Control BP180- B cells were analyzed in 3 groups (Figure S4): BP180- B cells from patients before RTX treatment (D0), BP180- B cells from patients after RTX (CR + CRMT) and CD19+ B cells from 2 HD. Interestingly, frequencies of cytokine gene expressing B cells were the same among BP180- B cells before and after RTX treatment, and HD for all cytokines except BAFF. Indeed, the frequency of BAFF expressing B cells was found at a significantly higher level in BP180- B cells from patients after RTX treatment compared to HD ( $7.5 \pm 4.8\%$  and 0 respectively, p-value = 0.0081, Figure S4).

Then, we compared the frequency of cytokine gene expressing B cells between the following groups: D0, CRMT, CR and HD for each cytokine gene. Regarding pro inflammatory cytokines, at D0,  $29.3 \pm 9\%$  of BP180+ B cells expressed IL-15,  $20.6 \pm 8\%$  expressed TRAIL,  $10.9 \pm 6.2\%$  expressed IL-6,  $8.7 \pm 5.6\%$  expressed IL1b,  $7.6 \pm 5.1\%$  expressed TNF $\alpha$  and  $4.3 \pm 4\%$  expressed TNF $\beta$  (Figure 5A). Interestingly, RTX impacted key pro inflammatory cytokine gene expression in CR patients as IL15 expression decreased 1.6-fold ( $18.0 \pm 10.8\%$ , p-value = 0.1195), IL6 expression significantly decreased to 0 (p-value = 0.0309), TNF $\alpha$  expression decreased 3.8-fold ( $2.0 \pm 1.9\%$ , p-value = 0.273) and TNF $\beta$  expression decreased 2.0-fold ( $2.0 \pm 1.9\%$ , p-value = 1.000) in comparison with D0. Surprisingly, frequency of TRAIL ( $26.0 \pm 12.4\%$ ) and IL-1 $\beta$  ( $18.0 \pm 10.9\%$ ) expressing B

cells was increased in CR patients (respectively compared to D0, p-value = 0.844 and p-value = 0.306). For CRMT patients, IL15, IL6 and TNF $\beta$  were largely decreased as well when compared to D0 ( $14.63 \pm 7.8\%$ ,  $6.1 \pm 5.3\%$  and  $0\%$  respectively, p-value = 0.014, 0.024 and 0.515). Moreover, frequency of TRAIL and IL-1 $\beta$  expressing B cells were decreased as well ( $6.1 \pm 5.3\%$  and  $2.4 \pm 2.4$  respectively, p-value = 0.001 and 0.040), and TNF $\alpha$  remained at baseline level ( $6.1 \pm 5.3\%$ , p-value = 0.776), which constituted 3 major discrepancies between the CRMT and CR groups. Moreover, BP180-specific IgG+ B cells expressing IL-6, TNF $\alpha$  and TNF $\beta$  found at D0 were no longer detectable in CR patients after RTX treatment.

Concerning anti-inflammatory cytokines, the frequency of BAFF expressing B cells were the same among BP180-specific B cells before and after RTX treatment. There was a 3-fold increase in BAFF expression in BP180-specific cells compared to HD B cells ( $24.5 \pm 8.6\%$  and  $7.5 \pm 8\%$ , p value = 0.0006, Figure 5B); APRIL expression was similar as the frequency of APRIL expressing B cells was near zero in HD B cells ( $10.5 \pm 7\%$  for D0 vs  $2.5 \pm 2.4\%$  for HD, p-value = 0.041). Interestingly, a higher frequency of IL-1RA expressing B cells were found in CR patients ( $16.0 \pm 10.3\%$ ) compared to D0 ( $6.8 \pm 5.0\%$ , p-value = 0.088), CRMT patients ( $4.8 \pm 4.7\%$ , p-value = 0.057) or HD ( $2.5 \pm 4.9\%$ , p-value = 0.040). Interestingly, BP180-specific IgM+ B cells expressing IL-10 and IL-1RA were only found in CR patients. Because IL-15 may play a role in eosinophil attraction and expansion, we measured IL-15 concentrations at the protein level in patients' sera. IL-15 was dosed in nine patients before and after RTX treatment by Luminex technology. Only three demonstrated a detectable level of IL-15 in sera before treatment ( $5.18 \pm 2.6$  pg/ml). After treatment, six patients had detectable concentrations of IL-15 in sera ( $1.6 \pm 0.4$  pg/ml), including the three previous patients at lower concentrations. Nevertheless, IL-15 was detectable at low levels in the sera of CRMT patients. Moreover, all those patients finished the clinical trial in CRMT.

Finally, cytokinic gene expression analysis revealed changes in the production of pro- and anti-inflammatory cytokine genes by autoimmune B cells after depletion.

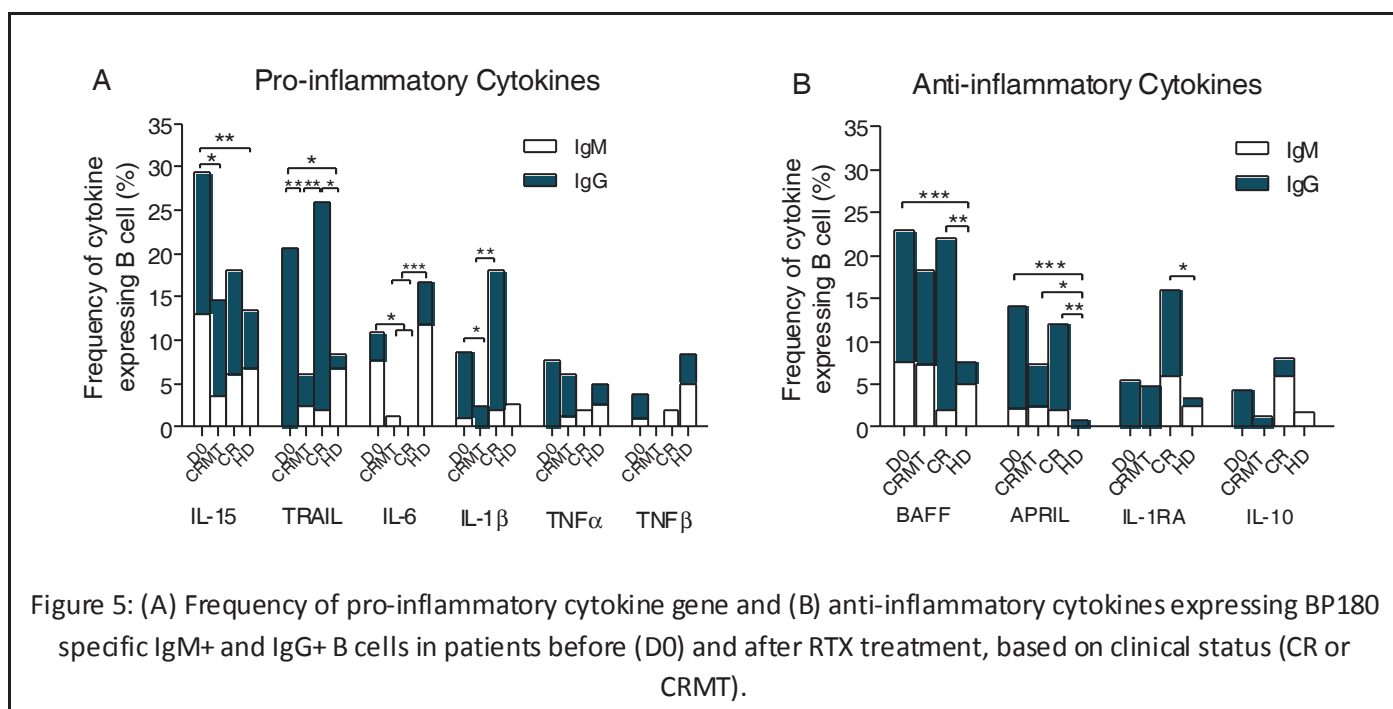


Figure 5: (A) Frequency of pro-inflammatory cytokine gene and (B) anti-inflammatory cytokines expressing BP180 specific IgM+ and IgG+ B cells in patients before (D0) and after RTX treatment, based on clinical status (CR or CRMT).

## Discussion

We report here the findings of a clinical study conducted in BP patients treated with RTX. Our study provides new information on the physiopathology of BP and an immunological response to this treatment. In this trial, 17 patients were followed for 2 years after treatment with RTX infusions. Rituximab showed efficacy in all patients who achieved disease control after initial RTX treatment. The mean age of patients ( $77.7 \pm 10.9$  years) and the severity of their disease (relapsing and cortico-resistant forms of BP) were contributing factors to the number of deaths ( $n = 5$ ) and the 1- and 2-year relapse rates at respectively 29.4% (95% CI: 10.3%-55.9%) and 41.2%, (95% CI: 18.4%-67.1%). A recent study on BP treatment by RTX demonstrated a higher CR rate with fewer relapses than in our study, but the mean age of patients was 68.2 years, 9.2 years younger than in our study, suggesting a higher rate of CR in younger patients (Ahmed et al. 2016). Follow-up of B cell subsets confirmed a large and profound depletion of total circulating B cells for 9 to 12 months in

parallel with a large decrease in BP180 and BP230 specific auto-antibodies titers. Phenotypic analysis of B cell subpopulations showed the re-emergence of transitional B cells and reversal of the balance between naive and memory B cells after B cell return, but flow cytometry analysis showed no difference in the number of IL-10+ regulating B cells after treatment or after in vitro stimulation of patients' B cells. These findings might explain the high rate of relapse in BP patients after RTX therapy (Shetty and Ahmed 2013; Ahmed et al. 2016) compared to pemphigus, in which we previously reported the prolonged re-emergence of IL-10 regulatory-B-cells after initial RTX-induced depletion in patients who achieved long-lasting CR off-therapy at 6 years (Colliou et al. 2013). Another clinical trial including seven patients with recalcitrant BP treated with RTX demonstrated that relapsing patients exhibited a higher level of memory B cells than patients in CR (Hall III et al. 2013). Reversal of the balance between naive and memory B cells seems to be a crucial element in controlling autoimmune emergence and it has been shown in other autoimmune diseases like rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (Anolik et al. 2007; Roll, Dörner, and Tony 2008; Nakou et al. 2009). Repertoire analysis showed skewed repertoire in all patients with oligoclonal bias during acute phase of the disease before RTX treatment. However, all patients recovered a Gaussian polyclonal repertoire on IgM after RTX treatment. Of note, normal expansion of B cells and diversity of VH usage on their BCR after depletion were demonstrated in older patients in whom we could expect oligoclonal bias even after B cell depletion (LeMaout, Szabo, and Weksler 1997; Allman and Miller 2005a; Frasca et al. 2008). These findings confirmed previous studies on the treatment of autoimmune diseases by depletion of B cells and the expansion of a new and normal B cell compartment, but studies are lacking in older patients (Maurer et al. 2012; Lee, Bae, and Song 2011). Rituximab impacts auto-antibody blood titers, B cell subpopulation homeostasis and global repertoire. Thus, one of the major impacts of B cell depletion therapy is the ratio of memory effector B cells to naive regulatory B cells which is reversed in favor of naive B cells, leading to a more

suppressive or tolerogenic cytokine profile (Joly et al. 2007; Lund 2008; Mouquet et al. 2008; Luu, Vazquez, and Zlotnik 2014).

Rituximab also induced a large decrease in BP180-specific IgG<sup>+</sup> and IgM<sup>+</sup> B cells in all patients, but autoimmune B cells remained at detectable levels after B cell return in patients in complete remission. To further explore the cellular mechanism of autoimmune B cell selection after RTX, we performed sequencing of the CDR3 of the BCR heavy chain of BP180 specific B cells before and after treatment. BP180-specific IgM<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> B cells before treatment preferentially use VH5 gene family. This shows a selection bias for the VH5 gene family during the acute phases of BP with a switch from VH5 BP180-specific IgM<sup>+</sup> B cell to the pathogenic VH5 IgG<sup>+</sup> B cell with a higher affinity for BP180. RTX treatment strongly impacted the autoimmune selection of B cells since the VH usage for IgM returned to normal with a majority of VH3 and VH4 BP180-specific IgM<sup>+</sup> B cells in parallel with the return of a Gaussian repertoire of total B cells. Furthermore, BP180-specific IgG<sup>+</sup> B cells were barely detectable after RTX treatment meaning that the remaining BP180 specific IgM B cells did not undergo selection to become pathogenic IgG<sup>+</sup> B cells. The impact of RTX on VH usage and isotopic switch blockade has already been demonstrated (Iannone et al. 2016; Maurer et al. 2016) but never in a BP context. The CDR3 of the heavy chain of BP180 specific IgG were sequenced before RTX treatment to find redundant motifs and 60% of them showed a Glycine in position 114. Three pathological human auto-antibodies against BP180 were sequenced and tested for pathogenicity in human skin (Li et al. 2010). Two of them showed a Glycine in position 114 on H-CDR3. These findings could explain one mechanism of selection based on pattern recognition of pre-pathogenic BP180-specific IgM<sup>+</sup> B cells to become pathogenic IgG<sup>+</sup> B cell. This pattern recognition has been demonstrated in pemphigus vulgaris in which a consensus amino-acid motif of D/E-X-X-X-W (D/E-acidic



amino-acid, W-tryptophan) was identified in the H-CDR3 of Dsg3 specific pathogenic IgG auto-antibodies (Yamagami et al. 2010).

For the first time, we were able to analyze autoimmune B cells at the single cell level. In order to question the functionality of BP180 specific B cells, we performed single cell qPCR analysis to measure the expression of a panel of 25 cytokines genes. Expression analyses were performed directly on cells after single cell-sorting, with no in vitro activation before qPCR. As a consequence, the expression levels of cytokine genes and frequency of cytokine expressing B cells reflect the in vivo functionality of BP180 specific circulating B cells. Among 25 cytokine genes, 10 were found unexpressed by single B cells including IL-2, IL-5, IL-9, IL-12p40, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-27p28 and TGFb2. The amount of RNAs contained in one cell was possibly too low, even after pre-amplification for detection and quantification by Biomark technology, or in any of the BP180-specific cells expressing any of those cytokines. Detected genes demonstrated a homogenous level of expression between single cells, which is why we analyzed qPCR results in frequency of cytokine gene expressing B cells. BP180- B cells from patients before and after RTX treatment were compared to B cells from HD and no significant change in frequency of cytokine expressing B cells was found. This means that BP180- B cells act like normal B cells from HD. Those results demonstrated normal expansion of humoral compartment in older patients. RTX impacted BP180-specific B cells since significant changes in frequency of cytokine expressing B cells were found. Before RTX, BP180 specific B cells exhibited a higher frequency of IL-15 and IL-6 compared to BP180 specific B cells after RTX treatment. Furthermore, BP180-specific IgG+ B cells expressing TNF $\alpha$ , found before RTX were no longer detectable in patients in CR after treatment. Together with these results, anti-inflammatory BP180 specific IL-10 and IL-1RA IgM B cells were detected only in patients in CR off treatment. These results suggest that an increase in frequency not only of IL-10 but

also of IL-1RA in parallel with a decrease in the pro-inflammatory cytokine IL-15, IL-6, and TNF $\alpha$  expressing B cells could be a mechanism of tolerance maintenance after RTX. The regulatory role of B subpopulations is marked by known IL-10 secretion (Nathan and Ding 2010; Mauri and Bosma 2012; Rosser and Mauri 2015). We demonstrated IL-1RA expression by autoimmune B cells after RTX treatment in CR patients.

IL-15 expressing B cells were found in  $29.3 \pm 9.0\%$  of BP180 specific B cells before treatment. The role of IL-15 in the physiopathology of BP has never been raised. In a model of human eosinophilic esophagitis disease, it was proposed that IL-15 could stimulate helper T cells to induce secretion of eosinophil-selective chemoattractants (Collins et al. 1995; Elsner et al. 1998). Fixation of IL-15 to its receptor IL-15R, on helper T cells, activates STAT5 and induces Th2 cytokine profile secretion by T cells notably IL-5, IL-13 and eotaxins 1 to 3 that are known to activate eosinophils. Indeed, IL-15 could explain the recruitment of innate immunity and also complete the model of eosinophil attraction in BP. Eosinophil attraction was imputed to IgE production that bind to mast cells and produce chemoattractants (Dimson et al. 2003). IL-15 was detectable at low levels in the sera of CRMT patients before and after RTX treatment. All these patients had relapsed during the trial meaning that even if IL-15 was not detectable in all patients before RTX treatment, the presence of IL-15 in sera can be correlated with lower efficacy of treatment.

In conclusion, IL-15 gene expression could represent a mechanism of eosinophil recruitment and proliferation. After B cell depletion by Rituximab, B cell populations recovered a polyclonal repertoire with a high level of naive B cells. In this study, plasticity of autoimmune B cells had been demonstrated; patients in complete remission exhibited disappearance of pathogenic effector compartment represented by BP180-specific IgG+ B cells expressing pro-inflammatory cytokines and expansion of new BP180-specific IgM+ B

cells expressing IL-10 and IL-1RA as a regulatory compartment controlling auto-reactivity after RTX treatment.

## **Materials and Methods**

### **Study design**

Eighteen BP patients were included in an interventional, non-randomized, open label, multicenter clinical trial (ClinicalTrials.gov number NCT00525616) to assess the efficacy and tolerance of a single cycle of Rituximab (RTX) in the treatment of cortico-dependent BP. Treatment consisted of two intravenous (IV) infusions each of RTX 1000 mg administered 15 days apart in addition to local corticosteroid (clobetasol). The primary endpoint was to assess whether a single cycle of RTX could achieve disease control in patients with cortico-dependent BP. Secondary endpoints were to avoid the use of long-term corticosteroids; and to evaluate the duration of disease control and side effects with a single cycle of RTX. The clinical and biological controls of BP were estimated every 7 days during a period of 1 month and thereafter every month during a period of 2 years. Adverse reactions were assessed throughout the clinical trial. Complete Remission (CR) was defined as the absence of new or established lesions, as well as the healing of all skin lesions with complete epithelialization when patients were off all therapy. CR on minimal therapy (CRMT) was defined as the absence of new or established lesions, as well as the healing of all skin lesions with complete epithelialization, when patients were still receiving minimal therapy—clobetasol for at least 2 months. Relapse was defined as the occurrence of new skin blisters after achievement of disease control.

### **Auto-antibody blood titers**

Titers of IgG antibodies against BP180 and BP230 were measured with Bullous Pemphigoid (BP) ELISA tests with 1:100 diluted serums following manufacturer protocol (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG).

### **Phenotypic analysis**

The phenotype of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was determined by six-color flow cytometry with murine monoclonal antibodies (mAbs) against CD3, CD4, CD8, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD27, CD38, CD56, and CD86 (Beckman Coulter and BD Biosciences). PBMCs were from BP patients before and after RTX treatment and 20 older healthy donors analyzed by Singapore Immunology Network (SIgN), Agency for Science, Technology and Research (A\*STAR).

### **IL-10 regulatory B cell culture and analysis**

Purified B cells ( $5 \times 10^5$ ) were cultured for 48 hours with CpG-B (3 mg/ml) and anti-human IgG+IgA+IgM (anti-Ig) antibody (Jackson Immuno Research) (20 mg/ml) in 1 ml of complete medium in 24-well flat-bottom tissue culture plates. Cells were first stained with anti-CD19, anti-CD24, anti-CD27, anti-CD38, and anti-CD5 mAb, and then fixed and permeabilized, followed by intracellular staining with antihuman IL-10 mAb (B-T10) or mouse IgG1 isotype control (MiltenyiBiotec). IL-10 was quantified in culture supernatant by ELISA (R&D Systems). All assays were carried out with duplicate samples.

### **Anti-BP180 B cell analysis and sorting**

Purified B cells from BP patients before and after treatment and two Healthy Donors (HD) were incubated for 1 hour at room temperature with histidine-tagged recombinant BP180 40  $\mu$ g/ml. After washing, anti-histidine coupled with phycoerythrin (R&D Systems) was used to identify BP180-stained cells. B cells were characterized with anti-human CD19 and anti-human IgG and IgM antibodies (BD Biosciences). The number of BP180-specific B cells per million was then determined.

### **CDR3-H amplification and sequences**

cDNA was synthesized in a total volume of 14  $\mu$ l/well in the original 96-well sorting plate. Total RNA from single cells was reverse transcribed in nuclease-free water using 150

ng random hexamer primer (pd(N)6, GE Healthcare), 0.5 µl of 10 mM each nucleotide dNTP-Mix (Invitrogen), 1 µl 0.1 M DTT (Invitrogen), 0.5% v/v NP40, 4 U RNAsin® (Promega), 6 U Prime RNase Inhibitor™ (Eppendorf) and 50 U Superscript® III reverse transcriptase (Invitrogen). Reverse transcription (RT) reaction was performed at 42 °C for 10 min, 25 °C for 10 min, 50 °C for 60 min and 94 °C for 5 min. cDNA was stored at -20 °C. IgH gene transcripts were amplified by nested PCR starting from 3.5 µl of cDNA as template. All PCR reactions were performed in 96-well plates in a total volume of 40 µl per well containing 20 nM primer mix (Table 1), 300 nM each dNTP (Invitrogen) and 1,2 U HotStar® Taq DNA polymerase (Qiagen). All primers were stored in small aliquots to avoid repeated freezing and thawing and all PCRs were performed with nuclease-free water. All nested PCR reactions with primer mix were performed with 3.5 µl of unpurified first PCR product (Table 1). Each round of PCR was performed for 50 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 55 s. PCR were checked for amplification in agarose gel 1.5% and revealed with BET and 2µL of second PCR products. Positive PCR products were purified with Nucleospin Gel and PCR cleanup (Macherey Nagel®) and sequencing reactions were done with selected primers (table 2) and Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing Kit (AB®) following manuals instructions. Sequencing files were analyzed with SeqScanner software (AB®) and blasted on IMGT.

Table 1: Primers sequences for CDR3-H amplification and sequence

|       |                    |    |                                 |
|-------|--------------------|----|---------------------------------|
| PCR 1 | VHL-1              | 5' | TCACCA TGGACTGSACCTGGA          |
|       | VHL-2              | 5' | CCATGGACACACTTIGYCCAC           |
|       | VHL-3              | 5' | TCACCA TGGAGTTTGGG              |
|       | VHL-4              | 5' | AGAACATGAAACAYCTGTGGTT          |
|       | VHL-5              | 5' | ATGGGGTCAACCCCATCCT             |
|       | VHL-6              | 5' | ACAATGTCGTCTCC TCC TCA          |
|       | C <sub>γ</sub> II  | 5' | GCCAGGGGAAGACSGATG              |
|       | C <sub>μ</sub> II  | 5' | CAGGAGACGAGGGGAAAAG             |
| PCR2  | VHF-1              | 5' | TTGCGGCCGCCAGGTSCAGCTGGTRCAGTC  |
|       | VHF-2              | 5' | TTGCGGCCGCCAGRTCACCTTGAAGGAGTC  |
|       | VHF-3              | 5' | TTGCGGCCGCSAGGTGCAGCTGGTGGAGTC  |
|       | VHF-4              | 5' | TTGCGGCCGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC  |
|       | VHF-5              | 5' | TTGCGGCCGCGARGTGCAGCTGGTGCAGTC  |
|       | VHF-6              | 5' | TTGCGGCCGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTC  |
|       | C <sub>γ</sub> III | 5' | AGGTCTAGAGACSGATGGGCCCTTGGTGGGA |
|       | C <sub>μ</sub> III | 5' | AGGTCTAGAGAAAAGGGTTGGGGCGGATGC  |

### *Cytokinin secretion profile*

BP180 specific single B cells were sorted by FACS ARIA III into 96-well plates containing 10 $\mu$ L Platinum Taq polymerase and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), a mixture of Taqman primer-probes at 0.2 $\times$  concentration specific for the transcripts of interest (supplementary Table 1) and CellsDirect qRT-PCR buffer (Invitrogen). Immediately following cell sorting, samples were centrifuged, incubated at 55 °C for 10 min, and subjected to 20 cycles of PCR (50 °C 15 min then 95 °C for 15 s for the reverse transcription, followed by 20 cycles of 95 °C 15 s and 60 °C 4 min for amplification). Subsequent preamplified single-cell cDNA was stored at -20 °C until analysis. After 1/4 dilution in TE buffer, each cDNA sample was then separated into 48 separate reactions for further qPCR using the BioMark 48.48 dynamic array nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.). Briefly, following hydraulic chip priming, 48 preamplified cDNA samples were mixed with a mild detergent loading solution to allow capillary flow, and the samples were added to a 48.48 nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.) along with 30 individual Taqman primer-probe mixtures listed in supplementary Table 1 (Applied Biosystems) specific for individual transcripts of interest, allowing a combination of each sample to mix with each probe in every possible combination (a total of 2,304 reactions). The chip was then thermocycled through 40 cycles and fluorescence in the FAM channel was detected using a CCD camera placed above the chip, normalized by ROX (6-carboxy-X-rhodamine) intensity. 100 CD19+ cell and no-cell were used as positive and negative control respectively. To limit potentially biased measurement, cells with less than 2 expressed genes among the 5 control genes (HPRT1, B2M, GUSB, TUBB and GAPDH) were excluded from the analysis. Data were analyzed using Real Time PCR Analysis software with or without normalization of the Ct value for each gene using GAPDH as calibrator gene. All primers were validated from cDNA of purified B cells stimulated or not by QPCR on Lightcycler (Roche). Sorted cells come from PBMC

### **Total B cell repertoire**

IgG and IgM repertoire was characterized at the molecular level in B cell PBMCs from four BP patients before treatment, four patients after treatment and two HD. Complementary DNA was prepared from  $10 \times 10^6$  PBMCs in a RLT lysis buffer (QIAGEN®). VH gene usage and CDR3 analysis were performed with the immunoscope method coupled with real time polymerase chain reaction (PCR) to provide quantitative information on VH usage.

### **IL-15 dosage in serum**

IL-15 was dosed in the sera of patients following the manufacturer's protocol of Milliplex MAP Kit (Millipore). No dilution was performed on serum. The plate was analyzed in the Luminex 100.

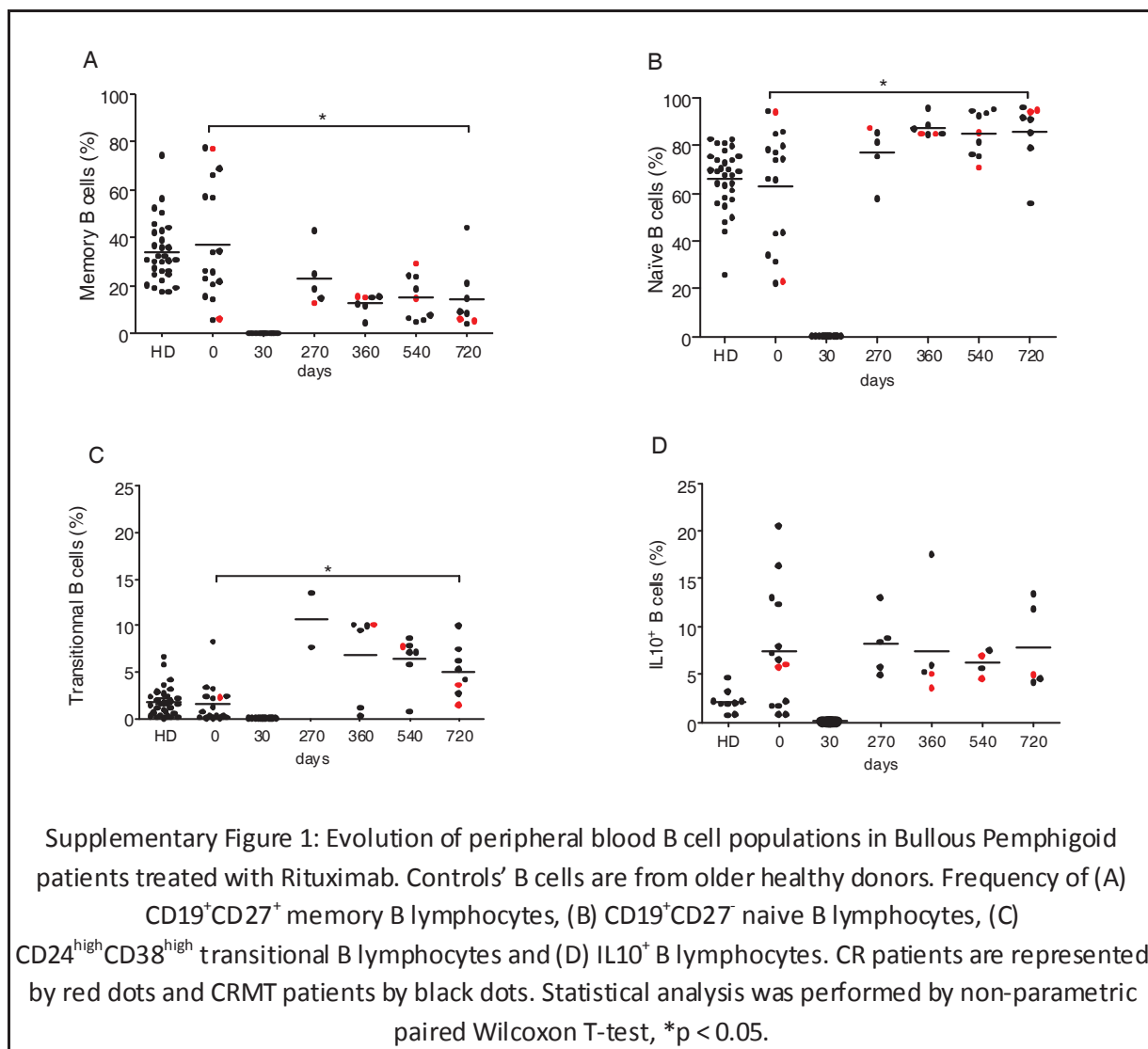
### **Statistical analysis**

Statistical comparisons were performed with the non-parametric Kruskal-Wallis Anova test, and the Wilcoxon signed-rank test was used for paired samples. Statistical comparison of the frequency of cytokine secreting cells was performed with Fisher's exact test. All statistical tests were done using GraphPad Prism Software. A p-value  $\leq 0.05$  was considered as significant.

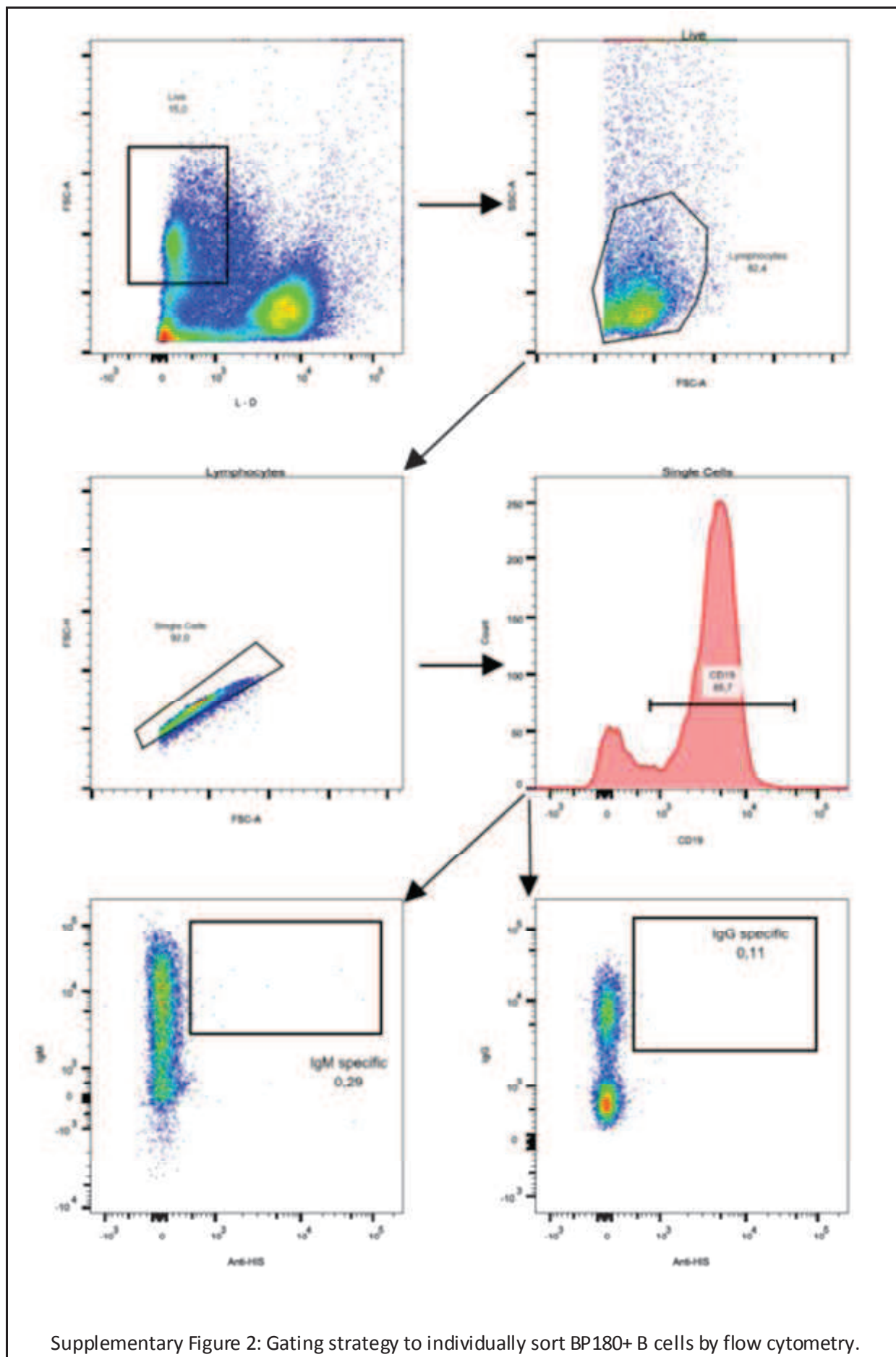
### **Study approval**

This study was approved by the Ethics Committee of the North West area I and conducted according to the Declaration of Helsinki principles (ClinicalTrials.gov number NCT00525616). Written informed consent was obtained from each patient with BP for collection of blood samples.

## Supplementary Materials







Supplementary Figure 2: Gating strategy to individually sort BP180+ B cells by flow cytometry.

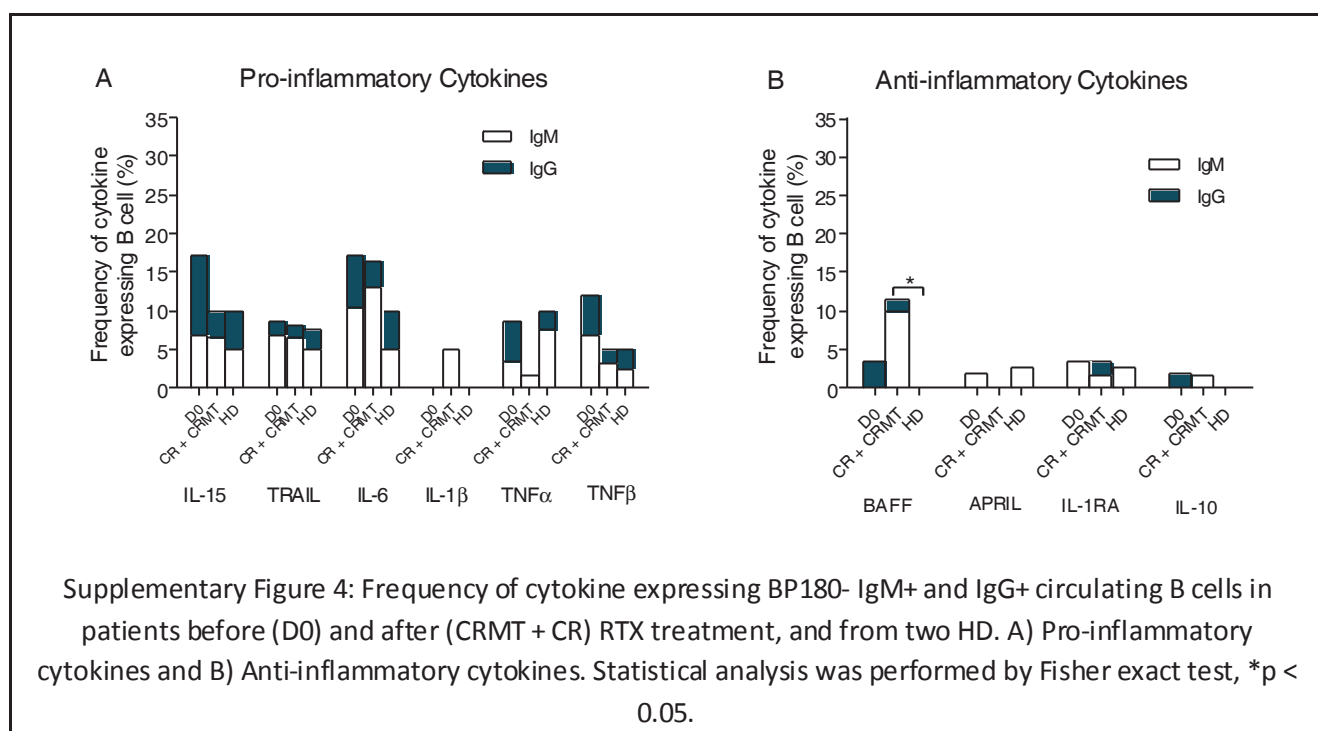
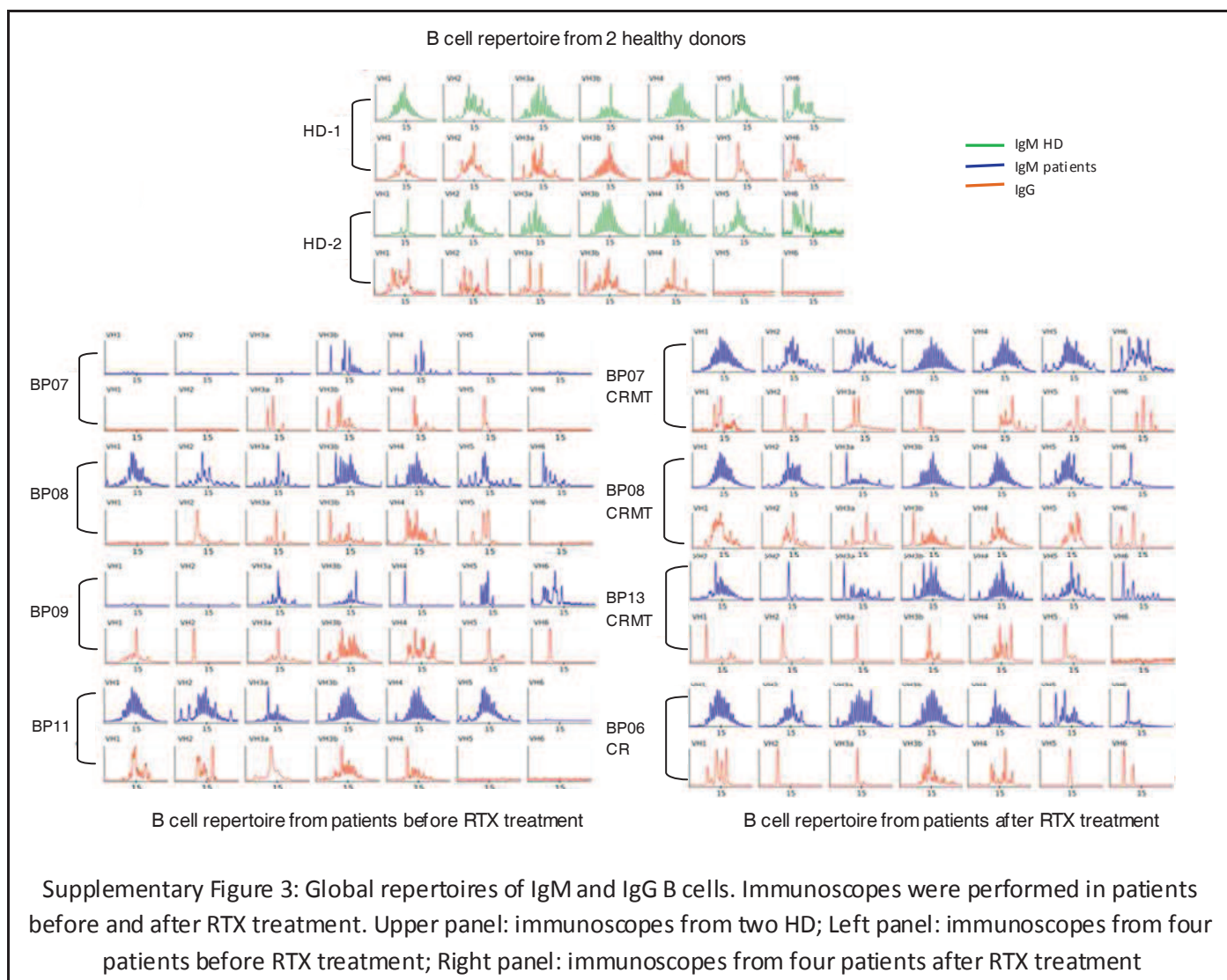


Table S1: characteristics of patients and clinical status.

| <u>Patient Id</u> | <u>Sex (Male / Female)</u> | <u>Age (years)</u> | <u>Disease Form (Paucibullous / Multibullous)</u> | <u>Relapses</u>       | <u>Adverse effects</u>                        | <u>Study discontinuation</u>        | <u>Clinical Status at the end</u> |
|-------------------|----------------------------|--------------------|---|-----------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <u>BP01</u>       | M                          | 85                 | P   | D600                  |   |                                     | CRMT                              |
| <u>BP02</u>       | F                          | 59                 | P   |                       |   | Died at D60                         |                                   |
| <u>BP03</u>       | F                          | 82                 | M   | D150<br>Until<br>D300 |   |                                     | CRMT                              |
| <u>BP04</u>       | M                          | 77                 | P   |                       |   | Died at D45                         |                                   |
| <u>BP05</u>       | F                          | 79                 | M   |                       |   |                                     | CR                                |
| <u>BP06</u>       | M                          | 66                 | P   | D90                   |   |                                     | CRMT                              |
| <u>BP07</u>       | F                          | 82                 | P   | D300                  |   |                                     | CRMT                              |
| <u>BP08</u>       | F                          | 80                 | M   | D270<br>Until<br>D660 |   | Treatment failure D660              |                                   |
| <u>BP09</u>       | F                          | 82                 | P   |                       |   | Died at D360                        |                                   |
| <u>BP10</u>       | F                          | 85                 | M   |                       |   |                                     | CR                                |
| <u>BP11</u>       | M                          | 86                 | M   |                       |   | Died at D60                         |                                   |
| <u>BP12</u>       | F                          | 79                 | P   |                       |   | Died at D210                        |                                   |
| <u>BP13</u>       | F                          | 83                 | M   | D270<br>D540          |   |                                     | CRMT                              |
| <u>BP14</u>       | F                          | 85                 | M   |                       | Severe cerebral hemorrhage at day of infusion | Adverse effect D0                   |                                   |
| <u>BP15</u>       | M                          | 79                 |   |                       |   | No inclusion<br>Pulmonary infection |                                   |
| <u>BP16</u>       | F                          | 77                 | P   |                       |   | Treatment Failure D390              |                                   |
| <u>BP17</u>       | M                          | 45                 | M   | D120<br>Until<br>D180 |   |                                     | CRMT                              |
| <u>BP18</u>       | M                          | 81                 | P   | D570                  |   |                                     | CRMT                              |

Table S2: Taqman primers used in High Throughput qPCR Biomark analysis.

| <b>Gene Name</b>          | <b>Assay ID</b> |
|---------------------------|-----------------|
| <b>Cytokine Genes</b>     |                 |
| IL-1 $\beta$              | Hs01555410_m1   |
| IL-1RA                    | Hs00893626_m1   |
| IL-2                      | Hs00174114_m1   |
| IL-5                      | Hs01548712_g1   |
| IL-6                      | Hs00985639_m1   |
| IL-7                      | Hs00174202_m1   |
| IL-9                      | Hs00914237_m1   |
| IL-10                     | Hs00961622_m1   |
| IL-12A                    | Hs01073447_m1   |
| IL-12B                    | Hs01011518_m1   |
| IL-13                     | Hs00174379_m1   |
| IL-15                     | Hs01003716_m1   |
| IL-17A                    | Hs00174383_m1   |
| IL-17F                    | Hs00369400_m1   |
| IFN $\gamma$              | Hs00989291_m1   |
| TNF $\alpha$              | Hs01113624_g1   |
| LTA                       | Hs04188773_g1   |
| TNFSF10                   | Hs00921974_m1   |
| IL-21                     | Hs00222327_m1   |
| TGF $\beta$ 2             | Hs00234244_m1   |
| TNFSF13B                  | Hs00198106_m1   |
| TNFSF13                   | Hs00601664_g1   |
| EBI3                      | Hs01057148_m1   |
| IL-27                     | Hs00377366_m1   |
| IL-23A                    | Hs00900828_g1   |
| <b>Housekeeping Genes</b> |                 |
| HPRT1                     | Hs02800695_m1   |
| B2M                       | Hs00984230_m1   |
| GUSB                      | Hs00939627_m1   |
| TUBB                      | Hs00742828_s1   |
| GAPDH                     | Hs02758991_g1   |

## **References and Notes:**

- Ahmed, A. Razzaque, Shawn Shetty, Srini Kaveri, and Zachary S. Spigelman  
2016 Treatment of Recalcitrant Bullous Pemphigoid (BP) with a Novel Protocol: A Retrospective Study with a 6-Year Follow-Up. *Journal of the American Academy of Dermatology* 74(4): 700–708.e3.
- Allman, David, and Juli P. Miller  
2005 B Cell Development and Receptor Diversity during Aging. *Current Opinion in Immunology* 17(5): 463–467.
- Anolik, Jennifer H., Jennifer Barnard, Teresa Owen, et al.  
2007 Delayed Memory B Cell Recovery in Peripheral Blood and Lymphoid Tissue in Systemic Lupus Erythematosus after B Cell Depletion Therapy. *Arthritis & Rheumatism* 56(9): 3044–3056.
- Chen, R., G. Ning, M. L. Zhao, et al.  
2001 Mast Cells Play a Key Role in Neutrophil Recruitment in Experimental Bullous Pemphigoid. *The Journal of Clinical Investigation* 108(8): 1151–1158.
- Collins, P. D., S. Marleau, D. A. Griffiths-Johnson, P. J. Jose, and T. J. Williams  
1995 Cooperation between Interleukin-5 and the Chemokine Eotaxin to Induce Eosinophil Accumulation in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 182(4): 1169–1174.
- Colliou, Natacha, Damien Picard, Frédérique Caillot, et al.  
2013 Long-Term Remissions of Severe Pemphigus after Rituximab Therapy Are Associated with Prolonged Failure of Desmoglein B Cell Response. *Science Translational Medicine* 5(175): 175ra30.
- Dimson, Otobia G., George J. Giudice, Chang Ling Fu, et al.  
2003 Identification of a Potential Effector Function for IgE Autoantibodies in the Organ-Specific Autoimmune Disease Bullous Pemphigoid. *The Journal of Investigative Dermatology* 120(5): 784–788.
- Elsner, Jörn, Holger Petering, Christof Kluthe, et al.  
1998 Eotaxin-2 Activates Chemotaxis-Related Events and Release of Reactive Oxygen Species via Pertussis Toxin-Sensitive G Proteins in Human Eosinophils. *European Journal of Immunology* 28(7): 2152–2158.
- Frasca, Daniela, Ana Marie Landin, Richard L. Riley, and Bonnie B. Blomberg  
2008 Mechanisms for Decreased Function of B Cells in Aged Mice and Humans. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180(5): 2741–2746.
- Hall III, Russell P., Robert D. Streilein, Deborah L. Hannah, et al.  
2013 Association of Serum B-Cell Activating Factor Level and Proportion of Memory and Transitional B Cells with Clinical Response after Rituximab Treatment of Bullous Pemphigoid Patients. *Journal of Investigative Dermatology* 133(12): 2786–2788.

Iannone, Florenzo, Marilina Tampoia, Margherita Giannini, et al.

2016 Changes in Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies and Rheumatoid Factor Isotypes Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis Following Treatment with Different Biological Drugs. *Clinical and Experimental Rheumatology* 34(3): 424–429.

Joly, Pascal

2008 Incidence of Bullous Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 337: a209.

Joly, Pascal, Hugo Mouquet, Jean-Claude Roujeau, et al.

2007 A Single Cycle of Rituximab for the Treatment of Severe Pemphigus. *The New England Journal of Medicine* 357(6): 545–552.

Joly, Pascal, Jean-Claude Roujeau, Jacques Benichou, et al.

2002 A Comparison of Oral and Topical Corticosteroids in Patients with Bullous Pemphigoid. *The New England Journal of Medicine* 346(5): 321–327.

Joly, P., P. Bernard, C. Bedane, et al.

2011 [Pemphigus. Guidelines for the diagnosis and treatment. Centres de référence des maladies bulleuses auto-immunes. Société Française de Dermatologie]. *Annales De Dermatologie Et De Vénéréologie* 138(3): 252–258.

Kasperkiewicz, Michael, Iakov Shimanovich, Ralf J. Ludwig, et al.

2011 Rituximab for Treatment-Refractory Pemphigus and Pemphigoid: A Case Series of 17 Patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* 65(3): 552–558.

Langan, S. M., L. Smeeth, R. Hubbard, et al.

2008 Bullous Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris--Incidence and Mortality in the UK: Population Based Cohort Study. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 337: a180.

Lee, Young Ho, Sang-Cheol Bae, and Gwan Gyu Song

2011 The Efficacy and Safety of Rituximab for the Treatment of Active Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Rheumatology International* 31(11): 1493–1499.

LeMaout, J., P. Szabo, and M. E. Weksler

1997 Effect of Age on Humoral Immunity, Selection of the B-Cell Repertoire and B-Cell Development. *Immunological Reviews* 160: 115–126.

Li, Qiang, Hideyuki Ujiie, Akihiko Shibaki, et al.

2010 Human IgG1 Monoclonal Antibody against Human Collagen 17 Noncollagenous 16A Domain Induces Blisters via Complement Activation in Experimental Bullous Pemphigoid Model. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185(12): 7746–7755.

Liu, Z., L. A. Diaz, S. J. Swartz, et al.

1995 Molecular Mapping of a Pathogenically Relevant BP180 Epitope Associated with Experimentally Induced Murine Bullous Pemphigoid. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 155(11): 5449–5454.

Liu, Z., G. J. Giudice, X. Zhou, et al.

1997 A Major Role for Neutrophils in Experimental Bullous Pemphigoid. *The Journal of Clinical Investigation* 100(5): 1256–1263.

Lund, Frances E.

2008 Cytokine-Producing B Lymphocytes – Key Regulators of Immunity. *Current Opinion in Immunology* 20(3): 332–338.

Luu, Van Phi, Monica I. Vazquez, and Albert Zlotnik

2014 B Cells Participate in Tolerance and Autoimmunity through Cytokine Production. *Autoimmunity* 47(1): 1–12.

Maurer, Michael A., Goran Rakocevic, Carol S. Leung, et al.

2012 Rituximab Induces Sustained Reduction of Pathogenic B Cells in Patients with Peripheral Nervous System Autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation* 122(4): 1393–1402.

Maurer, Michael A., Friederike Tuller, Viktoria Gredler, et al.

2016 Rituximab Induces Clonal Expansion of IgG Memory B-Cells in Patients with Inflammatory Central Nervous System Demyelination. *Journal of Neuroimmunology* 290: 49–53.

Mauri, Claudia, and Anneleen Bosma

2012 Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology* 30: 221–241.

Mouquet, Hugo, Philippe Musette, Marie-Lyse Gougeon, et al.

2008 B-Cell Depletion Immunotherapy in Pemphigus: Effects on Cellular and Humoral Immune Responses. *The Journal of Investigative Dermatology* 128(12): 2859–2869.

Nakou, Magda, Georgios Katsikas, Prodromos Sidiropoulos, et al.

2009 Rituximab Therapy Reduces Activated B Cells in Both the Peripheral Blood and Bone Marrow of Patients with Rheumatoid Arthritis: Depletion of Memory B Cells Correlates with Clinical Response. *Arthritis Research & Therapy* 11(4): R131.

Nathan, Carl, and Aihao Ding

2010 Nonresolving Inflammation. *Cell* 140(6): 871–882.

Roll, Petra, Thomas Dörner, and Hans-Peter Tony

2008 Anti-CD20 Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis: Predictors of Response and B Cell Subset Regeneration after Repeated Treatment. *Arthritis and Rheumatism* 58(6): 1566–1575.

Rosser, Elizabeth C., and Claudia Mauri

2015 Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42(4): 607–612.

Roussel, Aude, Jacques Benichou, Zely Arivelo Randriamanantany, et al.

2011 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Combination of Bullous Pemphigoid Antigens 1 and 2 in the Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Archives of Dermatology* 147(3): 293–298.

Schmidt, Enno, and Detlef Zillikens

2011 Diagnosis and Treatment of Patients with Autoimmune Bullous Disorders in Germany. *Dermatologic Clinics* 29(4): 663–671.

2013 Pemphigoid Diseases. *The Lancet* 381(9863): 320–332.

Schmidt, E., K. Obe, E. B. Bröcker, and D. Zillikens

2000 Serum Levels of Autoantibodies to BP180 Correlate with Disease Activity in Patients with Bullous Pemphigoid. *Archives of Dermatology* 136(2): 174–178.

Shetty, Shawn, and A. Razzaque Ahmed

2013 Treatment of Bullous Pemphigoid with Rituximab: Critical Analysis of the Current Literature. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD* 12(6): 672–677.

Yamagami, Jun, Aimee S. Payne, Stephen Kacir, et al.

2010 Homologous Regions of Autoantibody Heavy Chain Complementarity-Determining Region 3 (H-CDR3) in Patients with Pemphigus Cause Pathogenicity. *The Journal of Clinical Investigation* 120(11): 4111–4117.

Zillikens, Detlef, Pamela A. Rose, Shawn D. Balding, et al.

1997 Tight Clustering of Extracellular BP180 Epitopes Recognized by Bullous Pemphigoid Autoantibodies. *Journal of Investigative Dermatology* 109(4): 573–579.

## **Acknowledgments:**

We would like to thank the French Society of Dermatology for funding the clinical trial, and Roche Pharmaceutical company for providing the rituximab. We acknowledge the Centre d'immunologie humaine and the Centre de Recherche Translationnelle in Pasteur Institut for the access to Biomark Fluidigm technology and help. We are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for writing assistance and review of the manuscript in English. We acknowledge also Pr Anna Cumano and her team for the help in designing the experiments and technical support.



# Discussion Générale

---

Les maladies auto-immunes bulleuses représentées principalement par le PV et la PB sont caractéristiques des auto-immunités humorales pour lesquelles les cibles antigéniques sont identifiés, les auto-anticorps dosés et leurs taux sont corrélés au statut clinique des patients (Koch et al. 1997; Zillikens et al. 1997; Joly et al. 2011). Ces maladies auto-immunes ont été traitées par de multiples classes d'immunosuppresseurs et particulièrement les cortico-stéroïdes systémiques pour le PV et topiques pour la PB, menant à des rechutes fréquentes et à des effets secondaires qui peuvent être sévères compte tenu de l'âge des patients et des comorbidités associées (Nguyen et al. 2004; Roussel et al. 2011). Les traitements ont aujourd'hui évolué et l'utilisation des biothérapies est en train de fournir jour après jour de nouveaux médicaments qui enrichissent l'arsenal thérapeutique. La classe la plus utilisée des biothérapies est représentée par les anticorps monoclonaux. Ces anticorps monoclonaux ont pour cible des protéines membranaires, des cytokines ou des récepteurs de ces cytokines. Dans le cas des maladies auto-immunes bulleuses, la biothérapie la plus utilisée est le Rituximab (RTX). Le RTX est un anticorps monoclonal chimérique d'isotype IgG1 ayant pour cible le CD20, protéine transmembranaire présente à la surface des LB. La première utilisation de cette molécule a été réalisée pour le traitement des lymphomes B et des leucémies lymphoïdes aiguës ou chroniques B (Hagemeister 2010; Zwick et al. 2010). Ensuite, l'utilisation du RTX a été étendue à certaines maladies auto-immunes comme le lupus ou la PR (Sutter et al. 2008; Teng et al. 2009) mais aussi les myasthénies, les vascularites, le purpura thrombopénique auto-immun ainsi que les MBAI (Mahévas et al. 2013; Iorio et al. 2015; Joly et al. 2007). En effet, l'utilisation de cette molécule a pour conséquence biologique l'élimination des LB circulant et la diminution du taux d'auto-anticorps avec un retour du contingent B environ 1 an après le traitement. Ces conséquences

biologiques ont été mises en évidence dans de nombreux essais cliniques évaluant l'efficacité du RTX dans différentes MAI. Cependant, les rechutes restent fréquentes et les mécanismes de contrôles de l'auto-immunité après l'utilisation des traitements dépleteurs de LB restent inconnus. L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence des différences biologiques, phénotypiques et moléculaires entre les patients qui rechutent et ceux qui ne rechutent pas, après traitement Rituximab, dans le contexte du traitement des maladies auto-immunes bulleuses que sont le Pemphigus et la Pemphigoïde bulleuse. Nous avons pour objectifs d'identifier les mécanismes effecteurs et régulateurs qui contrôlent l'auto-immunité et pourraient expliquer les phénomènes de rechute et les rémissions complètes.

Dans ce contexte, nous avons à notre disposition des prélèvements sanguins provenant d'essais cliniques dans lesquels des patients atteints de maladies bulleuses auto-immunes ont été traités par RTX. Les résultats portant sur la PB, présentés dans la première partie sous forme d'article, proviennent de l'analyse de ces prélèvements de patients atteints de PB en rechute et cortico-résistante. Tout d'abord, le suivi clinique a montré une disparition de l'ensemble des bulles cutanées et une chute du taux d'auto-anticorps après le traitement chez tous les patients. Ces éléments mettent en évidence l'efficacité du RTX chez des patients sans autre alternative thérapeutique. Cependant, le bilan clinique à 2 ans du traitement montre que sur les 17 patients traités, 5 sont morts en cours d'étude et 3 sont sortis d'études soit pour un effet secondaire grave soit pour échec du traitement. Sur les 9 patients ayant fini l'essai, 2 sont en rémission complète et n'ont pas subi de rechute durant l'étude, les 7 autres ont terminé l'étude en rémission complète mais avec un traitement corticoïde topique et ont subi une ou plusieurs rechutes durant l'essai. Les causes de morts de ces patients ne semblent pas être liées au traitement RTX selon les avis des experts en Pharmacovigilance et peuvent être expliquées par l'âge avancé de nos patients ( $77.7 \pm 10.9$  ans) ainsi que les différentes

comorbidités dont souffrent les patients comme l'hypertension, le diabète de type 2, la maladie d'Alzheimer ou des atteintes cardiaques.

Le suivi biologique des patients a montré une déplétion B durant 9 mois à 1 an chez tous les patients et un retour de LB caractérisé par la genèse de LB transitionnels et une modification de la balance B mémoire / B naïfs qui perdure 2 ans. L'analyse par immunoscope a été effectuée sur différents patients avant et après traitement RTX montrant un répertoire B IgM et IgG réduits avec des pics oligoclonaux avant RTX et le retour d'un repertoire polyclonal et diversifié en IgM après traitement. Ces patients sont âgés et nous pouvions attendre la réapparition de pics oligoclonaux après reconstitution du compartiment de LB (LeMaoult, Szabo, and Weksler 1997; Frasca et al. 2008; Allman and Miller 2005b). Cela signifie que la moelle osseuse réagit à la déplétion de LB en synthétisant de nouveaux LB à phénotype transitionnel, et des LB IgM+ naïfs au répertoire diversifié. Cette modification de la balance LB naïfs / LB mémoires semble être un élément important dans le contrôle de l'auto-immunité comme cela a été montré dans d'autres maladies auto-immunes comme le lupus ou la PR (Nakou et al. 2009; Roll, Dörner, and Tony 2008; Anolik et al. 2007) mais aussi dans la PB (Hall III et al. 2013). Pour rechercher d'autres éléments de contrôle de l'auto-immunité, les LB régulateurs sécréteurs d'IL-10 ont été recherchés par une technique de stimulation de LB purifiés des patients 48H in vitro (Bouaziz et al. 2010). Aucune modification du pourcentage de LB IL-10+ n'a été remarquée après le retour des LB chez nos patients en comparaison avec leur niveau avant traitement. Cette observation est un des éléments qui pourrait expliquer un taux de rechute supérieur dans la PB. En effet, une augmentation significative du taux de LB IL-10+ avait été démontrée après traitement RTX de patients atteints de Pemphigus récalcitrant (Colliou et al. 2013). Néanmoins, la mesure a été effectuée 2 ans après le traitement RTX chez nos patients alors que l'expérience sur les patients atteints de Pemphigus a été effectuée à 5 ans de distance du traitement.

L'équipe du Pr Hertl à Marbourg (Allemagne) nous a fournis un peptide recombinant qui a la structure du domaine immuno-dominant NC16A de la BP180, antigène cible dans la PB. Cet immuno-domaine recombinant est pourvu d'une queue peptidique de 6 Histidine, motif non retrouvé naturellement et qui permet la fixation d'anticorps fluorescents pour une analyse au cytomètre des LB ayant fixé le peptide durant une incubation. Cette technique nous a permis plusieurs choses : Tout d'abord, nous avons pu suivre le taux circulant de LB spécifiques de la BP180. Ces lymphocytes ont été triés individuellement pour analyser la séquence du CDR3 de la chaîne lourde de leur BCR. Enfin, une analyse transcriptomique a été effectuée pour mesurer les niveaux d'expression des gènes codant pour des cytokines. Ces expériences ont pour objectifs de mesurer l'auto-immunité, d'analyser l'utilisation des gènes VH par ces LB auto-immuns, d'identifier des motifs redondants de sélections sur leur CDR3 et enfin d'analyser la fonctionnalité de ces LB et l'impact du traitement RTX sur le compartiment auto-réactif.

La mesure de la concentration des LB auto-immuns spécifiques de la BP180 montre 2 éléments intéressants. Le premier étant la baisse drastique de la concentration de LB BP180 spécifiques après traitement chez tous les patients. En effet le RTX a pour effet de dépléter tous les LB circulants y compris les auto-immuns à partir du moment où ils expriment le CD20 en parallèle de la baisse de sécrétion d'auto-anticorps. Le deuxième élément c'est la persistance de LB BP180 spécifiques, à bas niveau, non seulement chez les patients qui ont rechuté mais aussi chez les patients en rémission complète qui n'ont pas rechuté et qui sont sevrés en corticoïdes. Les questions de l'efficacité des mécanismes de sélection et de la fonctionnalité de ces cellules se posent. Le séquençage de la partie variable de la chaîne lourde de leur BCR nous a permis d'identifier un profil d'utilisation des gènes VH par les LB BP180+ circulant. En effet, les LB IgM+ et IgG+ BP180 spécifiques montrent une utilisation prédominante des gènes des familles VH5 qui n'est pas retrouvé après traitement au RTX. Les

LB IgM+ BP180 spécifiques retrouvent un profil d'utilisation VH normal et diversifié après traitement, ce qui suggère la levée d'un biais de sélection par le traitement RTX. De plus, l'analyse des séquences des CDR3 des LB IgG+ BP180 spécifiques avant traitement montre que 65% de ces LB IgG+ présentent une Glycine en position 114 (numérotation Kabat) qui pourrait être un motif de sélection préliminaire à la formation du contingent B effecteur mémoire IgG+ BP180 spécifique impliqué dans la physiopathologie de la PB comme il a été montré dans le Pemphigus pour des LB spécifiques de la Dsg3 (Cho et al. 2014:1; Yamagami et al. 2010; Qian et al. 2007). Ces éléments ne permettent pas de savoir pourquoi certains patients rechutent, cependant l'analyse de la fonctionnalité des LB BP180 spécifiques après RTX nous a fourni des pistes de réflexion.

En effet, la technique de qPCR haut débit supportée par la technologie Biomark Fluidigm permet d'effectuer jusqu'à 48 mesures d'expression génique simultanées sur un échantillon de l'ordre d'une cellule. C'est ce qui nous a permis la mesure simultanée des niveaux d'expression des gènes codant pour des cytokines sur chaque LB identifié comme étant auto-immun. Les mesures des niveaux d'expression des gènes de cytokines des LB BP180 spécifiques triés individuellement ont permis d'identifier des signatures d'expression cytokiniques chez ces LB auto-réactifs avant et après traitement chez des patients en rémission complète comparé aux patients ayant rechuté. Il est important de souligner que ces cellules ont été triées directement à partir des cellules sanguines des patients et qu'il n'y a pas eu d'étape de stimulation ex-vivo, reflétant ainsi l'état physiologique de la cellule dans l'organisme du patient, comme une photographie de l'état des cellules à un moment de l'essai clinique. Les analyses des mesures d'expression génique ont d'abord montré que parmi notre panel de 25 gènes codant pour des cytokines, 10 ne semblent pas être exprimées par les LB individuellement alors que les témoins positifs constitués de 100 LB font apparaître un niveau d'expression mesurable. Il est possible que la quantité de matériel de départ soit trop faible,

même après la pré-amplification, pour être détecté à l'échelle d'une cellule. De plus, lors du calcul du  $\Delta C_t$  pour chaque gène individuellement, en utilisant GAPDH comme gène de ménage, les niveaux d'expression sont similaires entre les cellules. Il est possible que la procédure de pré-amplification en amont de l'analyse qPCR puisse niveler la quantité d'ADNc mesurée. Cependant il existe une variabilité inter-génique importante, l'analyse des mesures d'expression génique des cellules a donc été effectuée en comparant les fréquences de LB exprimant un gène de cytokine entre nos groupes de patients qui rechutent et ceux qui ne rechutent pas..

Il a été montré qu'avant traitement RTX, une forte proportion des LB BP180 spécifiques exprimait les gènes de l'IL-15, de TRAIL, de l'IL-6, de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  qui sont des cytokines pro-inflammatoires. Le RTX impacte ces profils car il est démontré une diminution de l'expression de ces cytokines sauf TRAIL et IL-1 $\beta$  pour les patients en CR. De plus, l'analyse de l'expression de cytokines anti-inflammatoires montre une apparition de LB IgM+ BP180 spécifiques après RTX exprimant de l'IL-10 et de l'IL-1RA. Ces cellules ne sont retrouvées que chez les patients en RC parallèlement à la disparition des LB IgG+ BP180 spécifiques exprimant le TNF $\alpha$  qui sont retrouvés uniquement chez les patients ayant rechuté. Ces informations nous permettent d'émettre l'hypothèse d'un contrôle de la pathogénicité des LB par l'inhibition de la formation d'une population effectrice de LB IgG+ auto-réactifs exprimant des cytokines pro-inflammatoires (IL-15, IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ), au profit de l'expansion de la population régulatrice de LB IgM+ BP180 spécifiques exprimant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IL-1RA.

Il est à noter que la cytokine la plus exprimée par les LB BP180 spécifiques avant traitement est l'IL-15. En effet, en moyenne 30% des LB l'expriment comparé à environ 15% après traitement ou dans le groupe des LB de donneurs sains. L'implication de l'IL-15 dans la physiopathologie de la PB n'est pas connue. Différentes études chez l'humain et chez la

souris ont mis en évidence un lien entre la sécrétion d'IL-15 et le recrutement et l'activation des éosinophiles, ainsi qu'une polarisation Th2 par les LTh (Collins et al. 1995; Elsner et al. 1998). En effet, dans le modèle de pathologie inflammatoire d'oesophagite à éosinophile, une surexpression transcriptionnelle du gène de l'IL-15 par les cellules épithéliales de l'oesophage a été mise en évidence. Le modèle physiopathologique proposé par cette étude est que la stimulation de LTh par l'IL-15, activant ainsi STAT5, induit une polarisation Th2 sécrétant ainsi de l'IL-5, de l'IL-13 et les éotaxines 1 et 3 connus pour leur pouvoir activateur des éosinophiles. Ainsi, l'IL-15 pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la PB au moment de sa sécrétion par les LB BP180+ avant traitement RTX et provoquer l'éosinophilie caractéristique de la PB. Cependant les dosages sériques d'IL-15 chez les patients atteints de PB montrent une très faible quantité d'IL-15 circulante, de l'ordre du pg/ $\mu$ L. Cela suggère une action locale de l'IL-15, à l'échelle intercellulaire.

Cette étude montre pour la première fois la plasticité du compartiment auto-réactif des LB dans un contexte de maladie auto-immune bulleuse traitée par RTX. En effet, les données phénotypiques, de séquençage et de mesures d'expression génique convergent vers l'hypothèse d'un contrôle homéostatique du compartiment effecteur responsable de la pathologie par une population régulatrice qui est stimulée après déplétion des LB par le RTX chez les patients répondeurs contrairement aux patients qui rechutent, chez lesquels on retrouve une résurgence du compartiment effecteur.

La PB et le PV sont des maladies auto-immunes à auto-anticorps pour lesquelles les cibles antigéniques sont bien identifiées mais également les acteurs de la pathologie. C'est pour cela que le RTX a été utilisé en traitement de ces deux maladies pour dépléter les LB et stopper la production d'auto-anticorps responsables de la pathogénicité. Cependant, dans ces maladies, la réponse au RTX n'est pas toujours complète car certains patients rechutent (Joly et al. 2007; Mouquet et al. 2008; Shetty and Ahmed 2013). Les différentes approches utilisées

lors de ces travaux ont eu pour objectif de mettre en évidence ces différences pour poser des hypothèses mécanistiques de rechute après RTX. Les différents travaux concernant ces maladies et leur traitement par RTX ont mis en évidence une persistance des LB spécifiques de la BP180 ou des Dsg1 et 3 chez les patients après traitement RTX ainsi que des taux d'auto-anticorps bas mais toujours détectables (Cho et al. 2014; Colliou et al. 2013). La présence de ces acteurs de l'auto-immunité même chez les patients en RC nous fait émettre l'hypothèse d'un contrôle de la pathogénicité tant à l'échelle de toute la population B qu'à l'échelle des LB spécifiques des auto-antigènes.

Ces travaux ont mis en évidence, après traitement par RTX, le retour de LB au profil transitionnel ainsi que le maintien d'un fort pourcentage de LB naïfs à distance du traitement qui semble être favorable au maintien de la rémission. Ce retour de LB naïfs IgM+ est caractérisé par un répertoire BCR qui retrouve un profil polyclonal diversifié comme dans d'autres travaux (Hall III et al. 2013; Colliou et al. 2013).

L'analyse du répertoire et du profil d'expression des gènes de cytokine des LB BP180 a suggéré que les nouveaux LB IgM+ spécifiques de la BP180 ont un profil tolérogène, capables d'exprimer de l'IL-10 et de l'IL-1RA. L'IL-10 est une cytokine qui inhibe l'activation des LTh (Lykken, Candando, and Tedder 2015) et l'IL-1RA et un récepteur soluble à l'IL-1 $\beta$  qui inhibe l'effet pro-inflammatoire de l'IL-1 $\beta$  en le fixant. La balance IL-1 / IL-1RA semble jouer un rôle important dans de nombreuses pathologies comme la PR, les maladies inflammatoires intestinales et les cancers (Arend 2002). Ces cellules ne sont retrouvées que chez les patients en RC. Il est possible que la présence de ces LB régulateurs puisse contrôler et inhiber la formation ou la prolifération de LB IgG+ spécifiques de la BP180 au profil pro-inflammatoire, réels acteurs de la pathologie. Cette hypothèse rejoint celle avancée dans les travaux précédents portant sur le PV dans lesquels il est évoqué une inhibition du switch isotypique après RTX par des LB régulateurs empêchant la synthèse de



LB IgG+ spécifiques de la Dsg1 ou 3 pathogéniques. En effet, le niveau de LB sécrétant de l'IL-10 après stimulation 48h in vitro des LB circulants est retrouvé supérieur chez les patients en RC à 6 ans de distance du traitement RTX (Colliou et al. 2013). Dans le cas de la PB, ces recherches n'ont pas indiqué cette différence entre les patients en RC et ceux qui ont rechutés à seulement 2 ans de distance du traitement RTX. Cette différence est un des éléments qui pourraient expliquer un plus fort taux de rechute chez les patients atteints de PB.

Des différences entre les patients qui rechutent et ceux qui ne rechutent pas ont été découvertes. Ces différences permettent d'émettre de nouvelles hypothèses sur le déclenchement et le contrôle de l'auto-immunité dans le contexte des MBAI et notamment sur la présence d'un contingent de LB spécifiques de la BP180 au profil régulateur chez les patients en RC malgré la persistance d'auto-anticorps sanguins. La présence de LB spécifiques d'un auto-antigène n'est pas synonyme d'état pathologique si ces cellules ont un profil régulateur. L'analyse unicellulaire a permis de mettre en évidence des différences de répertoire et de fonctionnalité des cellules auto-réactives qui n'auraient pas été détectées autrement qu'à cette échelle. Cependant, la faible fréquence de LB spécifiques d'un auto-antigène restreint la quantité d'analyses possibles. Les nouvelles technologies d'analyses du transcriptome entier à l'échelle d'une cellule permettront d'identifier d'autres différences et d'autres éléments avec la même quantité de prélèvement permettant d'expliquer le mécanisme fin du déclenchement de l'auto-immunité pathologique. Il serait intéressant de stratifier davantage les sous populations de LB auto-réactives, les marqueurs de surface, les facteurs de transcription ou les voies de signalisation différenciant les compartiments régulateurs et effecteurs de l'auto-immunité. La découverte de voies de signalisation cellulaire ou de marqueurs spécifiques à ces populations permettrait d'identifier de nouvelles cibles, voies ou approches thérapeutiques pour les patients qui rechutent après traitement au RTX ou de compléter le traitement RTX par des adjuvants inhibant la résurgence du contingent effecteur.

En conclusion, ces travaux ont permis d'analyser l'efficacité du RTX en traitement de la PB récalcitrante, de mieux comprendre la physiopathologie de la PB et l'impact du RTX sur l'immunité humorale, de mettre en évidence des différences moléculaires entre les patients qui rechutent et ceux qui ne rechutent pas. Ces éléments permettent d'émettre de nouvelles hypothèses physiopathologiques complétant les modèles existant et ouvrent sur de nouvelles perspectives de travail pour répondre toujours plus précisément à la question des éléments déclencheurs de l'auto-immunité et de son contrôle.

# Références

---

- Abreu-Velez, Ana Maria, and Michael S. Howard  
2012 Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. *North American Journal of Medical Sciences* 4(1): 1–8.
- Ahmed, A. Razzaque, Shawn Shetty, Srini Kaveri, and Zachary S. Spigelman  
2016 Treatment of Recalcitrant Bullous Pemphigoid (BP) with a Novel Protocol: A Retrospective Study with a 6-Year Follow-Up. *Journal of the American Academy of Dermatology* 74(4): 700–708.e3.
- Alduaij, Waleed, and Tim M. Illidge  
2011 The Future of Anti-CD20 Monoclonal Antibodies: Are We Making Progress? *Blood* 117(11): 2993–3001.
- Allman, David, and Juli P. Miller  
2005a B Cell Development and Receptor Diversity during Aging. *Current Opinion in Immunology* 17(5): 463–467.  
2005b B Cell Development and Receptor Diversity during Aging. *Current Opinion in Immunology* 17(5): 463–467.
- Amagai, M., K. Tsunoda, D. Zillikens, T. Nagai, and T. Nishikawa  
1999 The Clinical Phenotype of Pemphigus Is Defined by the Anti-Desmoglein Autoantibody Profile. *Journal of the American Academy of Dermatology* 40(2 Pt 1): 167–170.
- Anand, D., U. Kumar, M. Kanjilal, S. Kaur, and N. Das  
2014 Leucocyte Complement Receptor 1 (CR1/CD35) Transcript and Its Correlation with the Clinical Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients. *Clinical and Experimental Immunology* 176(3): 327–335.
- Anhalt, G. J., S. C. Kim, J. R. Stanley, et al.  
1990 Paraneoplastic Pemphigus. An Autoimmune Mucocutaneous Disease Associated with Neoplasia. *The New England Journal of Medicine* 323(25): 1729–1735.
- Anhalt, G. J., G. O. Till, L. A. Diaz, et al.  
1986 Defining the Role of Complement in Experimental Pemphigus Vulgaris in Mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 137(9): 2835–2840.
- Anolik, Jennifer H., Jennifer Barnard, Teresa Owen, et al.  
2007 Delayed Memory B Cell Recovery in Peripheral Blood and Lymphoid Tissue in Systemic Lupus Erythematosus after B Cell Depletion Therapy. *Arthritis & Rheumatism* 56(9): 3044–3056.
- Arend, William P.  
2002 The Balance between IL-1 and IL-1Ra in Disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13(4-5): 323–340.
- Arora, V., R. Grover, A. Kumar, D. Anand, and N. Das  
2011 Relationship of Leukocyte CR1 Transcript and Protein with the Pathophysiology and Prognosis of Systemic Lupus Erythematosus: A Follow-up Study. *Lupus* 20(10): 1010–1018.

- Auriemma, Matteo, Thomas Brzoska, Lars Klenner, et al.  
2012 A-MSH-Stimulated Tolerogenic Dendritic Cells Induce Functional Regulatory T Cells and Ameliorate Ongoing Skin Inflammation. *The Journal of Investigative Dermatology* 132(7): 1814–1824.
- Baroni, Adone, Alessandro Lanza, Nicola Cirillo, et al.  
2007 Vesicular and Bullous Disorders: Pemphigus. *Dermatologic Clinics* 25(4): 597–603, ix.
- Blair, Paul A., Lina Yassin Noreña, Fabian Flores-Borja, et al.  
2010 CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* 32(1): 129–140.
- Borde, Madhuri, Robert A. Barrington, Vigo Heissmeyer, Michael C. Carroll, and Anjana Rao  
2006 Transcriptional Basis of Lymphocyte Tolerance. *Immunological Reviews* 210: 105–119.
- Bouaziz, Jean-David, Sebastien Calbo, Maud Maho-Vaillant, et al.  
2010 IL-10 Produced by Activated Human B Cells Regulates CD4(+) T-Cell Activation in Vitro. *European Journal of Immunology* 40(10): 2686–2691.
- Brown, Keith D., Estefania Claudio, and Ulrich Siebenlist  
2008 The Roles of the Classical and Alternative Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathways: Potential Implications for Autoimmunity and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 10(4): 212.
- Carter, Natalie A., Rita Vasconcellos, Elizabeth C. Rosser, et al.  
2011 Mice Lacking Endogenous IL-10-Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186(10): 5569–5579.
- Chasset, François, Adèle de Masson, Hélène Le Buanec, et al.  
2016 APRIL Levels Are Associated with Disease Activity in Human Chronic Graft-versus-Host Disease. *Haematologica* 101(7): e312–315.
- Chen, R., G. Ning, M. L. Zhao, et al.  
2001 Mast Cells Play a Key Role in Neutrophil Recruitment in Experimental Bullous Pemphigoid. *The Journal of Clinical Investigation* 108(8): 1151–1158.
- Cho, Michael Jeffrey, Agnes S. Y. Lo, Xuming Mao, et al.  
2014 Shared VH1-46 Gene Usage by Pemphigus Vulgaris Autoantibodies Indicates Common Humoral Immune Responses among Patients. *Nature Communications* 5: 4167.
- Collins, P. D., S. Marleau, D. A. Griffiths-Johnson, P. J. Jose, and T. J. Williams  
1995 Cooperation between Interleukin-5 and the Chemokine Eotaxin to Induce Eosinophil Accumulation in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 182(4): 1169–1174.
- Colliou, Natacha, Damien Picard, Frédérique Caillot, et al.  
2013 Long-Term Remissions of Severe Pemphigus after Rituximab Therapy Are Associated with Prolonged Failure of Desmoglein B Cell Response. *Science Translational Medicine* 5(175): 175ra30.
- Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin, and J. W. Dennis  
2001 Negative Regulation of T-Cell Activation and Autoimmunity by Mgat5 N-Glycosylation. *Nature* 409(6821): 733–739.
- Dent, Jennifer E., and Christine Nardini  
2013 From Desk to Bed: Computational Simulations Provide Indication for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. *BMC Systems Biology* 7: 10.

- Dimson, Otobia G., George J. Giudice, Chang Ling Fu, et al.  
2003 Identification of a Potential Effector Function for IgE Autoantibodies in the Organ-Specific Autoimmune Disease Bullous Pemphigoid. *The Journal of Investigative Dermatology* 120(5): 784–788.
- Ding, Qing, Melissa Yeung, Geoffrey Camirand, et al.  
2011 Regulatory B Cells Are Identified by Expression of TIM-1 and Can Be Induced through TIM-1 Ligation to Promote Tolerance in Mice. *The Journal of Clinical Investigation* 121(9): 3645–3656.
- Elsner, Jörn, Holger Petering, Christof Kluthe, et al.  
1998 Eotaxin-2 Activates Chemotaxis-Related Events and Release of Reactive Oxygen Species via Pertussis Toxin-Sensitive G Proteins in Human Eosinophils. *European Journal of Immunology* 28(7): 2152–2158.
- Erdei, Anna, Andrea Isaák, Katalin Török, et al.  
2009 Expression and Role of CR1 and CR2 on B and T Lymphocytes under Physiological and Autoimmune Conditions. *Molecular Immunology* 46(14): 2767–2773.
- Evans, Jamie G., Karina A. Chavez-Rueda, Ayad Eddaoudi, et al.  
2007 Novel Suppressive Function of Transitional 2 B Cells in Experimental Arthritis. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 178(12): 7868–7878.
- Fairley, Janet A., Christopher T. Burnett, Chang-Ling Fu, et al.  
2007 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. *The Journal of Investigative Dermatology* 127(11): 2605–2611.
- Fairley, Janet A., Chang Ling Fu, and George J. Giudice  
2005 Mapping the Binding Sites of Anti-BP180 Immunoglobulin E Autoantibodies in Bullous Pemphigoid. *The Journal of Investigative Dermatology* 125(3): 467–472.
- Fillatreau, Simon, Claire H. Sweeney, Mandy J. McGeachy, David Gray, and Stephen M. Anderton  
2002 B Cells Regulate Autoimmunity by Provision of IL-10. *Nature Immunology* 3(10): 944–950.
- Flores-Borja, Fabian, Anneleen Bosma, Dorothy Ng, et al.  
2013 CD19+CD24hiCD38hi B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting TH1 and TH17 Differentiation. *Science Translational Medicine* 5(173): 173ra23.
- Frasca, Daniela, Ana Marie Landin, Richard L. Riley, and Bonnie B. Blomberg  
2008 Mechanisms for Decreased Function of B Cells in Aged Mice and Humans. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 180(5): 2741–2746.
- Friebel, Kristin, Roland Schönherr, Raimund W. Kinne, and Elke Kunisch  
2015 Functional Role of the KCa3.1 Potassium Channel in Synovial Fibroblasts from Rheumatoid Arthritis Patients. *Journal of Cellular Physiology* 230(7): 1677–1688.
- Gay, D., T. Saunders, S. Camper, and M. Weigert  
1993 Receptor Editing: An Approach by Autoreactive B Cells to Escape Tolerance. *The Journal of Experimental Medicine* 177(4): 999–1008.
- Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, et al.  
1988 Altered Immunoglobulin Expression and Functional Silencing of Self-Reactive B Lymphocytes in Transgenic Mice. *Nature* 334(6184): 676–682.

- Gray, M., K. Miles, D. Salter, D. Gray, and J. Savill  
2007 Apoptotic Cells Protect Mice from Autoimmune Inflammation by the Induction of Regulatory B Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(35): 14080–14085.
- Hagemeister, Fredrick  
2010 Rituximab for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Drugs* 70(3): 261–272.
- Hall III, Russell P., Robert D. Streilein, Deborah L. Hannah, et al.  
2013 Association of Serum B-Cell Activating Factor Level and Proportion of Memory and Transitional B Cells with Clinical Response after Rituximab Treatment of Bullous Pemphigoid Patients. *Journal of Investigative Dermatology* 133(12): 2786–2788.
- He, Xi, Kyewon Park, and Dietmar J. Kappes  
2010 The Role of ThPOK in Control of CD4/CD8 Lineage Commitment. *Annual Review of Immunology* 28: 295–320.
- Hiroyasu, Sho, Toshiyuki Ozawa, Hiromi Kobayashi, et al.  
2013 Bullous Pemphigoid IgG Induces BP180 Internalization via a Macropinocytic Pathway. *The American Journal of Pathology* 182(3): 828–840.
- Iannone, Florenzo, Marilina Tampoia, Margherita Giannini, et al.  
2016 Changes in Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies and Rheumatoid Factor Isotypes Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis Following Treatment with Different Biological Drugs. *Clinical and Experimental Rheumatology* 34(3): 424–429.
- Iorio, Raffaele, Valentina Damato, Paolo Emilio Alboini, and Amelia Evoli  
2015 Efficacy and Safety of Rituximab for Myasthenia Gravis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Neurology* 262(5): 1115–1119.
- Iwata, Yohei, Takashi Matsushita, Mayuka Horikawa, et al.  
2011 Characterization of a Rare IL-10–competent B-Cell Subset in Humans That Parallels Mouse Regulatory B10 Cells. *Blood* 117(2): 530–541.
- Janeway, C. A., C. C. Goodnow, and R. Medzhitov  
1996 Danger - Pathogen on the Premises! Immunological Tolerance. *Current Biology: CB* 6(5): 519–522.
- Joly, Pascal  
2008 Incidence of Bullous Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 337: a209.
- Joly, Pascal, Hugo Mouquet, Jean-Claude Roujeau, et al.  
2007 A Single Cycle of Rituximab for the Treatment of Severe Pemphigus. *The New England Journal of Medicine* 357(6): 545–552.
- Joly, Pascal, Jean-Claude Roujeau, Jacques Benichou, et al.  
2002 A Comparison of Oral and Topical Corticosteroids in Patients with Bullous Pemphigoid. *The New England Journal of Medicine* 346(5): 321–327.
- Joly, P., P. Bernard, C. Bedane, et al.  
2011 [Pemphigus. Guidelines for the diagnosis and treatment. Centres de référence des maladies bulleuses auto-immunes. Société Française de Dermatologie]. *Annales De Dermatologie Et De Vénérologie* 138(3): 252–258.

- Kahan, Shannon M., E. John Wherry, and Allan J. Zajac  
2015 T Cell Exhaustion during Persistent Viral Infections. *Virology* 479-480: 180–193.
- Kasperkiewicz, Michael, Iakov Shimanovich, Ralf J. Ludwig, et al.  
2011 Rituximab for Treatment-Refractory Pemphigus and Pemphigoid: A Case Series of 17 Patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* 65(3): 552–558.
- Katz, S. I., D. Parker, and J. L. Turk  
1974 B-Cell Suppression of Delayed Hypersensitivity Reactions. *Nature* 251(5475): 550–551.
- Keir, Mary E., Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, and Arlene H. Sharpe  
2008 PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology* 26: 677–704.
- Koc, Cilem Kaya, Nilgun Sallakci, Ayşe Akman-Karakaş, Erkan Alpsoy, and Olcay Yegin  
2013 Human Leukocyte Antigens Class I and Class II in Patients with Pemphigus in Southern Turkey. *International Journal of Dermatology* 52(1): 53–58.
- Koch, P. J., M. G. Mahoney, H. Ishikawa, et al.  
1997 Targeted Disruption of the Pemphigus Vulgaris Antigen (desmoglein 3) Gene in Mice Causes Loss of Keratinocyte Cell Adhesion with a Phenotype Similar to Pemphigus Vulgaris. *The Journal of Cell Biology* 137(5): 1091–1102.
- Köhler, G., and C. Milstein  
1975 Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 256(5517): 495–497.
- Langan, S. M., L. Smeeth, R. Hubbard, et al.  
2008 Bullous Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris--Incidence and Mortality in the UK: Population Based Cohort Study. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 337: a180.
- Lazzari, Elisa, and Caroline A. Jefferies  
2014 IRF5-Mediated Signaling and Implications for SLE. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 153(2): 343–352.
- Leandro, M. J., G. Cambridge, J. C. Edwards, M. R. Ehrenstein, and D. A. Isenberg  
2005 B-Cell Depletion in the Treatment of Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Longitudinal Analysis of 24 Patients. *Rheumatology (Oxford, England)* 44(12): 1542–1545.
- Lee, Young Ho, Sang-Cheol Bae, and Gwan Gyu Song  
2011 The Efficacy and Safety of Rituximab for the Treatment of Active Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Rheumatology International* 31(11): 1493–1499.
- LeMaout, J., P. Szabo, and M. E. Weksler  
1997 Effect of Age on Humoral Immunity, Selection of the B-Cell Repertoire and B-Cell Development. *Immunological Reviews* 160: 115–126.
- Li, Haidong, Linda M. Ayer, Maria J. Polyak, et al.  
2004 The CD20 Calcium Channel Is Localized to Microvilli and Constitutively Associated with Membrane Rafts: Antibody Binding Increases the Affinity of the Association through an Epitope-Dependent Cross-Linking-Independent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 279(19): 19893–19901.

- Lin, Wenyu, Daniela Cerny, Edmond Chua, et al.  
2014 Human Regulatory B Cells Combine Phenotypic and Genetic Hallmarks with a Distinct Differentiation Fate. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 193(5): 2258–2266.
- Li, Qiang, Hideyuki Ujiie, Akihiko Shibaki, et al.  
2010 Human IgG1 Monoclonal Antibody against Human Collagen 17 Noncollagenous 16A Domain Induces Blisters via Complement Activation in Experimental Bullous Pemphigoid Model. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 185(12): 7746–7755.
- Liu, Z., L. A. Diaz, S. J. Swartz, et al.  
1995 Molecular Mapping of a Pathogenically Relevant BP180 Epitope Associated with Experimentally Induced Murine Bullous Pemphigoid. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 155(11): 5449–5454.
- Liu, Z., G. J. Giudice, X. Zhou, et al.  
1997 A Major Role for Neutrophils in Experimental Bullous Pemphigoid. *The Journal of Clinical Investigation* 100(5): 1256–1263.
- Lund, Frances E.  
2008 Cytokine-Producing B Lymphocytes – Key Regulators of Immunity. *Current Opinion in Immunology* 20(3): 332–338.
- Luu, Van Phi, Monica I. Vazquez, and Albert Zlotnik  
2014 B Cells Participate in Tolerance and Autoimmunity through Cytokine Production. *Autoimmunity* 47(1): 1–12.
- Lykken, Jacquelyn M., Kathleen M. Candando, and Thomas F. Tedder  
2015 Regulatory B10 Cell Development and Function. *International Immunology* 27(10): 471–477.
- Madsen, Lars Siim, Palle Christophersen, and Søren-Peter Olesen  
2005 Blockade of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in T Cells: An Option for the Treatment of Multiple Sclerosis? *European Journal of Immunology* 35(4): 1023–1026.
- Mahévas, Matthieu, Pauline Patin, François Huetz, et al.  
2013 B Cell Depletion in Immune Thrombocytopenia Reveals Splenic Long-Lived Plasma Cells. *The Journal of Clinical Investigation* 123(1): 432–442.
- De Masson, Adèle, Jean-David Bouaziz, Héléne Le Buanec, et al.  
2015 CD24(hi)CD27<sup>+</sup> and Plasmablast-like Regulatory B Cells in Human Chronic Graft-versus-Host Disease. *Blood* 125(11): 1830–1839.
- Matsumoto, Masanori, Akemi Baba, Takafumi Yokota, et al.  
2014 Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity* 41(6): 1040–1051.
- Maurer, Michael A., Goran Rakocevic, Carol S. Leung, et al.  
2012 Rituximab Induces Sustained Reduction of Pathogenic B Cells in Patients with Peripheral Nervous System Autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation* 122(4): 1393–1402.
- Maurer, Michael A., Friederike Tuller, Viktoria Gredler, et al.  
2016 Rituximab Induces Clonal Expansion of IgG Memory B-Cells in Patients with Inflammatory Central Nervous System Demyelination. *Journal of Neuroimmunology* 290: 49–53.
- Mauri, Claudia, and Anneleen Bosma  
2012 Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology* 30: 221–241.



- Messingham, Kelly N., Rupasree Srikantha, Amy M. DeGueme, and Janet A. Fairley  
2011 FcR-Independent Effects of IgE and IgG Autoantibodies in Bullous Pemphigoid. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 187(1): 553–560.
- Moncada, B., S. Kettelsen, J. L. Hernández-Moctezuma, and F. Ramirez  
1982 Neonatal Pemphigus Vulgaris: Role of Passively Transferred Pemphigus Antibodies. *The British Journal of Dermatology* 106(4): 465–467.
- Morgan, Rodney, Guoyan Gao, Judy Pawling, et al.  
2004 N-Acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-Mediated N-Glycosylation Negatively Regulates Th1 Cytokine Production by T Cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 173(12): 7200–7208.
- Mouquet, Hugo, Philippe Musette, Marie-Lyse Gougeon, et al.  
2008 B-Cell Depletion Immunotherapy in Pemphigus: Effects on Cellular and Humoral Immune Responses. *The Journal of Investigative Dermatology* 128(12): 2859–2869.
- Mueller, Daniel L.  
2010 Mechanisms Maintaining Peripheral Tolerance. *Nature Immunology* 11(1): 21–27.
- Nakou, Magda, Georgios Katsikas, Prodromos Sidiropoulos, et al.  
2009 Rituximab Therapy Reduces Activated B Cells in Both the Peripheral Blood and Bone Marrow of Patients with Rheumatoid Arthritis: Depletion of Memory B Cells Correlates with Clinical Response. *Arthritis Research & Therapy* 11(4): R131.
- Nathan, Carl, and Aihao Ding  
2010 Nonresolving Inflammation. *Cell* 140(6): 871–882.
- Nelson, Kelly C., Minglang Zhao, Pamela R. Schroeder, et al.  
2006 Role of Different Pathways of the Complement Cascade in Experimental Bullous Pemphigoid. *The Journal of Clinical Investigation* 116(11): 2892–2900.
- Nemazee, D., and K. Buerki  
1989 Clonal Deletion of Autoreactive B Lymphocytes in Bone Marrow Chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(20): 8039–8043.
- Neves, Patricia, Vicky Lampropoulou, Elisabeth Calderon-Gomez, et al.  
2010 Signaling via the MyD88 Adaptor Protein in B Cells Suppresses Protective Immunity during *Salmonella Typhimurium* Infection. *Immunity* 33(5): 777–790.
- Nguyen, Vu Thuong, Juan Arredondo, Alexander I. Chernyavsky, et al.  
2004 Pemphigus Vulgaris IgG and Methylprednisolone Exhibit Reciprocal Effects on Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 279(3): 2135–2146.
- Nielsen, M., J. Gerwien, C. Geisler, et al.  
1998 MHC Class II Ligation Induces CD58 (LFA-3)-Mediated Adhesion in Human T Cells. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 15(2): 61–68.
- Nishie, Wataru, Stephanie Lamer, Andreas Schlosser, et al.  
2010 Ectodomain Shedding Generates Neoepitopes on Collagen XVII, the Major Autoantigen for Bullous Pemphigoid. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 185(8): 4938–4947.
- Nishie, Wataru, Daisuke Sawamura, Maki Goto, et al.  
2007 Humanization of Autoantigen. *Nature Medicine* 13(3): 378–383.

- Ouchida, Rika, Tomohiro Kurosaki, and Ji-Yang Wang  
2010 A Role for Lysosomal-Associated Protein Transmembrane 5 in the Negative Regulation of Surface B Cell Receptor Levels and B Cell Activation. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 185(1): 294–301.
- Ouchida, Rika, Sho Yamasaki, Masaki Hikida, et al.  
2008 A Lysosomal Protein Negatively Regulates Surface T Cell Antigen Receptor Expression by Promoting CD3zeta-Chain Degradation. *Immunity* 29(1): 33–43.
- Park, Jung-Hyun, Stanley Adoro, Terry Guinter, et al.  
2010 Signaling by Intrathymic Cytokines, Not T Cell Antigen Receptors, Specifies CD8 Lineage Choice and Promotes the Differentiation of Cytotoxic-Lineage T Cells. *Nature Immunology* 11(3): 257–264.
- Payne, Aimee S., Ken Ishii, Stephen Kacir, et al.  
2005 Genetic and Functional Characterization of Human Pemphigus Vulgaris Monoclonal Autoantibodies Isolated by Phage Display. *The Journal of Clinical Investigation* 115(4): 888–899.
- Pelanda, R., S. Schwers, E. Sonoda, et al.  
1997 Receptor Editing in a Transgenic Mouse Model: Site, Efficiency, and Role in B Cell Tolerance and Antibody Diversification. *Immunity* 7(6): 765–775.
- Petrie, Ryan J., and Julie P. Deans  
2002 Colocalization of the B Cell Receptor and CD20 Followed by Activation-Dependent Dissociation in Distinct Lipid Rafts. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 169(6): 2886–2891.
- Picerno, Valentina, Francesco Ferro, Antonella Adinolfi, et al.  
2015 One Year in Review: The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 33(4): 551–558.
- Polyak, Maria J., Haidong Li, Neda Shariat, and Julie P. Deans  
2008 CD20 Homo-Oligomers Physically Associate with the B Cell Antigen Receptor. Dissociation upon Receptor Engagement and Recruitment of Phosphoproteins and Calmodulin-Binding Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 283(27): 18545–18552.
- Pope, Janet E., and Sindhu R. Johnson  
2015 New Classification Criteria for Systemic Sclerosis (Scleroderma). *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 41(3): 383–398.
- Punwani, Divya, Karen Simon, Youngnim Choi, et al.  
2012 Transcription Factor Zinc Finger and BTB Domain 1 Is Essential for Lymphocyte Development. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 189(3): 1253–1264.
- Qian, Ye, Luis A. Diaz, Jian Ye, and Stephen H. Clarke  
2007 Dissecting the Anti-Desmoglein Autoreactive B Cell Repertoire in Pemphigus Vulgaris Patients. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 178(9): 5982–5990.
- Rafei, Moutih, Jeremy Hsieh, Simone Zehntner, et al.  
2009 A Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-15 Fusokine Induces a Regulatory B Cell Population with Immune Suppressive Properties. *Nature Medicine* 15(9): 1038–1045.

- Relle, Manfred, Julia Weinmann-Menke, Eva Scorletti, Lorenzo Cavagna, and Andreas Schwarting  
2015 Genetics and Novel Aspects of Therapies in Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmunity Reviews* 14(11): 1005–1018.
- Rodríguez-Cortez, Virginia C., Lucia Del Pino-Molina, Javier Rodríguez-Ubreva, et al.  
2015 Monozygotic Twins Discordant for Common Variable Immunodeficiency Reveal Impaired DNA Demethylation during Naïve-to-Memory B-Cell Transition. *Nature Communications* 6: 7335.
- Roguedas, A.-M., P. Youinou, G. Lemasson, Y.-L. Penneç, and L. Misery  
2006 Primary Gougerot-Sjögren Syndrome: A Dermatological Approach. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV* 20(3): 243–247.
- Roll, Petra, Thomas Dörner, and Hans-Peter Tony  
2008 Anti-CD20 Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis: Predictors of Response and B Cell Subset Regeneration after Repeated Treatment. *Arthritis and Rheumatism* 58(6): 1566–1575.
- Rosser, Elizabeth C., and Claudia Mauri  
2015 Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42(4): 607–612.
- Rosser, Elizabeth C., Kristine Oleinika, Silvia Tonon, et al.  
2014 Regulatory B Cells Are Induced by Gut Microbiota-Driven Interleukin-1 $\beta$  and Interleukin-6 Production. *Nature Medicine* 20(11): 1334–1339.
- Roussel, Aude, Jacques Benichou, Zely Arivelo Randriamanantany, et al.  
2011 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Combination of Bullous Pemphigoid Antigens 1 and 2 in the Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Archives of Dermatology* 147(3): 293–298.
- Ryan, Elizabeth J., Aaron J. Marshall, Dario Magaletti, et al.  
2002 Dendritic Cell-Associated Lectin-1: A Novel Dendritic Cell-Associated, C-Type Lectin-like Molecule Enhances T Cell Secretion of IL-4. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 169(10): 5638–5648.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda  
1995 Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 155(3): 1151–1164.
- Santos, Soraya Neves Marques Barbosa dos, Gisele Viana de Oliveira, André Luiz Pasqua Tavares, et al.  
2005 Collagen XVIII and Fibronectin Involvement in Bullous Scleroderma. *Dermatology Online Journal* 11(1): 17.
- Schiltz, J. R., and B. Michel  
1976 Production of Epidermal Acantholysis in Normal Human Skin in Vitro by the IgG Fraction from Pemphigus Serum. *The Journal of Investigative Dermatology* 67(2): 254–260.
- Schmidt, Enno, and Detlef Zillikens  
2011 Diagnosis and Treatment of Patients with Autoimmune Bullous Disorders in Germany. *Dermatologic Clinics* 29(4): 663–671.  
2013 Pemphigoid Diseases. *The Lancet* 381(9863): 320–332.
- Schmidt, E., K. Obe, E. B. Bröcker, and D. Zillikens  
2000 Serum Levels of Autoantibodies to BP180 Correlate with Disease Activity in Patients with Bullous Pemphigoid. *Archives of Dermatology* 136(2): 174–178.

- Schmidt, E., S. Reimer, N. Kruse, et al.  
2000 Autoantibodies to BP180 Associated with Bullous Pemphigoid Release Interleukin-6 and Interleukin-8 from Cultured Human Keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology* 115(5): 842–848.
- Sekiguchi, M., Y. Futei, Y. Fujii, et al.  
2001 Dominant Autoimmune Epitopes Recognized by Pemphigus Antibodies Map to the N-Terminal Adhesive Region of Desmogleins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167(9): 5439–5448.
- Shalev, Itay, Moritz Schmelzle, Simon C. Robson, and Gary Levy  
2011 Making Sense of Regulatory T Cell Suppressive Function. *Seminars in Immunology* 23(4): 282–292.
- Shen, Ping, Toralf Roch, Vicky Lampropoulou, et al.  
2014 IL-35-Producing B Cells Are Critical Regulators of Immunity during Autoimmune and Infectious Diseases. *Nature* 507(7492): 366–370.
- Shetty, Shawn, and A. Razzaque Ahmed  
2013 Treatment of Bullous Pemphigoid with Rituximab: Critical Analysis of the Current Literature. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD* 12(6): 672–677.
- Shi, G. P., R. A. Bryant, R. Riese, et al.  
2000 Role for Cathepsin F in Invariant Chain Processing and Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Loading by Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 191(7): 1177–1186.
- Shiraishi, S., T. Iio, Y. Shirakata, et al.  
1991 Bullous Pemphigoid in a Patient with a C4 Deficiency. *The British Journal of Dermatology* 124(3): 296–298.
- Sigurdsson, Snaevar, Harald H. H. Göring, Gudlaug Kristjansdottir, et al.  
2008 Comprehensive Evaluation of the Genetic Variants of Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) Reveals a Novel 5 Bp Length Polymorphism as Strong Risk Factor for Systemic Lupus Erythematosus. *Human Molecular Genetics* 17(6): 872–881.
- Sigurdsson, Snaevar, Leonid Padyukov, Fina A. S. Kurreeman, et al.  
2007 Association of a Haplotype in the Promoter Region of the Interferon Regulatory Factor 5 Gene with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 56(7): 2202–2210.
- Smith-Garvin, Jennifer E., Gary A. Koretzky, and Martha S. Jordan  
2009 T Cell Activation. *Annual Review of Immunology* 27: 591–619.
- Somoza, John R., James T. Palmer, and Joseph D. Ho  
2002 The Crystal Structure of Human Cathepsin F and Its Implications for the Development of Novel Immunomodulators. *Journal of Molecular Biology* 322(3): 559–568.
- Spurlock, Charles F., John T. Tossberg, Nancy J. Olsen, and Thomas M. Aune  
2015 Cutting Edge: Chronic NF- $\kappa$ B Activation in CD4+ T Cells in Rheumatoid Arthritis Is Genetically Determined by HLA Risk Alleles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195(3): 791–795.

- Sun, Jia-Bin, Carl-Fredrik Flach, Cecil Czerkinsky, and Jan Holmgren  
2008 B Lymphocytes Promote Expansion of Regulatory T Cells in Oral Tolerance: Powerful Induction by Antigen Coupled to Cholera Toxin B Subunit. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 181(12): 8278–8287.
- Sutter, Jennifer A., Jennifer Kwan-Morley, Jon Dunham, et al.  
2008 A Longitudinal Analysis of SLE Patients Treated with Rituximab (anti-CD20): Factors Associated with B Lymphocyte Recovery. *Clinical Immunology* (Orlando, Fla.) 126(3): 282–290.
- Takahashi, Hayato, Masataka Kuwana, and Masayuki Amagai  
2009 A Single Helper T Cell Clone Is Sufficient to Commit Polyclonal Naive B Cells to Produce Pathogenic IgG in Experimental Pemphigus Vulgaris. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 182(3): 1740–1745.
- Teeling, Jessica L., Ruth R. French, Mark S. Cragg, et al.  
2004 Characterization of New Human CD20 Monoclonal Antibodies with Potent Cytolytic Activity against Non-Hodgkin Lymphomas. *Blood* 104(6): 1793–1800.
- Teng, Y. K. O., J. Tekstra, F. C. Breedveld, et al.  
2009 Rituximab Fixed Retreatment versus on-Demand Retreatment in Refractory Rheumatoid Arthritis: Comparison of Two B Cell Depleting Treatment Strategies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68(6): 1075–1077.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell, and D. Nemazee  
1993 Receptor Editing in Self-Reactive Bone Marrow B Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 177(4): 1009–1020.
- Valdor, Rut, and Fernando Macian  
2013 Induction and Stability of the Anergic Phenotype in T Cells. *Seminars in Immunology* 25(4): 313–320.
- Vattemi, Gaetano, Matteo Marini, Marzia Di Chio, et al.  
2014 Polymyositis in Solid Organ Transplant Recipients Receiving Tacrolimus. *Journal of the Neurological Sciences* 345(1-2): 239–243.
- Walshe, Claire A., Stephen A. Beers, Ruth R. French, et al.  
2008 Induction of Cytosolic Calcium Flux by CD20 Is Dependent upon B Cell Antigen Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 283(25): 16971–16984.
- Wang, Ren-Xi, Cheng-Rong Yu, Ivy M. Dambuza, et al.  
2014 Interleukin-35 Induces Regulatory B Cells That Suppress Autoimmune Disease. *Nature Medicine* 20(6): 633–641.
- Wells, Andrew D.  
2009 New Insights into the Molecular Basis of T Cell Anergy: Anergy Factors, Avoidance Sensors, and Epigenetic Imprinting. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 182(12): 7331–7341.
- Worthington, John J., Aoife Kelly, Catherine Smedley, et al.  
2015 Integrin  $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- $\beta$  Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 42(5): 903–915.
- Yamagami, Jun, Aimee S. Payne, Stephen Kacir, et al.  
2010 Homologous Regions of Autoantibody Heavy Chain Complementarity-Determining Region 3 (H-CDR3) in Patients with Pemphigus Cause Pathogenicity. *The Journal of Clinical Investigation* 120(11): 4111–4117.

- Yanaba, Koichi, Jean-David Bouaziz, Karen M. Haas, et al.  
2008 A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* 28(5): 639–650.
- Yan, L., J-M. Wang, and K. Zeng  
2012 Association between HLA-DRB1 Polymorphisms and Pemphigus Vulgaris: A Meta-Analysis. *British Journal of Dermatology* 167(4): 768–777.
- Yayli, S., N. Pelivani, H. Beltraminelli, et al.  
2011 Detection of Linear IgE Deposits in Bullous Pemphigoid and Mucous Membrane Pemphigoid: A Useful Clue for Diagnosis. *The British Journal of Dermatology* 165(5): 1133–1137.
- Yokoyama, Tomoaki, Satoshi Matsuda, Yujiro Takae, et al.  
2011 Antigen-Independent Development of Foxp3+ Regulatory T Cells Suppressing Autoantibody Production in Experimental Pemphigus Vulgaris. *International Immunology* 23(6): 365–373.
- Yoshizaki, Ayumi, Tomomitsu Miyagaki, David J. DiLillo, et al.  
2012 Regulatory B Cells Control T-Cell Autoimmunity through IL-21-Dependent Cognate Interactions. *Nature* 491(7423): 264–268.
- Di Zenzo, Giovanni, Giulia Di Lullo, Davide Corti, et al.  
2012 Pemphigus Autoantibodies Generated through Somatic Mutations Target the Desmoglein-3 Cis-Interface. *The Journal of Clinical Investigation* 122(10): 3781–3790.
- Zillikens, Detlef, Pamela A. Rose, Shawn D. Balding, et al.  
1997 Tight Clustering of Extracellular BP180 Epitopes Recognized by Bullous Pemphigoid Autoantibodies. *Journal of Investigative Dermatology* 109(4): 573–579.
- Zwick, Carsten, Niels Murawski, Michael Pfreundschuh, and German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group  
2010 Rituximab in High-Grade Lymphoma. *Seminars in Hematology* 47(2): 148–155.

## **BERKANI Nicolas**

### **Etude des mécanismes de reconstitution de l'immunité humorale chez des patients atteints de Pemphigoïde Bulleuse traités par Rituximab.**

Th. D. Pharm., Rouen, 2016, 122p.

---

#### **RESUME**

La Pemphigoïde Bulleuse est une maladie auto-immune caractérisée par la production d'auto-anticorps ciblant une protéine de l'épiderme (BP180). La fixation de ces auto-anticorps induit le décollement du derme et de l'épiderme formant des bulles. Le Rituximab provoque une déplétion des lymphocytes B et a montré son efficacité dans d'autres pathologies lympho-prolifératives ou auto-immunes. C'est pourquoi notre laboratoire a voulu tester l'efficacité du Rituximab sur 17 patients atteints de Pemphigoïde Bulleuse récalcitrante et/ou en rechute. Un suivi immunologique de 2 ans a été effectué pour mettre en évidence des différences biologiques phénotypiques ou moléculaires entre les patients répondeurs et non-répondeurs pour expliquer les phénomènes de rechute. Sur 17 patients, 5 sont décédés, 3 sont sortis d'études et 9 terminent l'essai clinique en rémission complète dont 7 qui ont subi au moins une rechute et sont encore sous traitement. Le suivi clinique montre la disparition des bulles chez tous les patients après traitement par Rituximab parallèlement à une diminution des taux d'auto-anticorps. Le suivi biologique des populations de lymphocytes B confirme la déplétion durant 9 à 12 mois. Le retour des lymphocytes B est caractérisé par un fort taux de B naïfs. L'analyse du répertoire B global par immunoscope montre le retour d'un répertoire diversifié et gaussien après traitement. L'utilisation d'un peptide recombinant de la BP180 nous a permis de compter et de trier les lymphocytes spécifiques de la pathologie. Nous avons montré que le taux de lymphocytes B spécifiques de la pathologie diminue après traitement mais ces cellules restent présentes même chez les patients en rémission complète. Le séquençage de leur BCR nous indique un changement dans les profils d'utilisation de gènes VH après Rituximab ainsi que la présence d'un motif de sélection sur le CDR3 (Glycine en 114) des lymphocytes responsables de la pathologie. De plus, nous avons analysé les profils d'expression génique des gènes de cytokines sur chaque cellule triée. Cette étude montre une diminution d'un contingent pro-inflammatoire de cellules auto-réactives exprimant de l'IL-15, de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 avant traitement au profit d'une population auto-immune anti-inflammatoire exprimant l'IL-10 et l'IL-1RA retrouvée chez les patients en rémission complète. Ces éléments permettent de mieux comprendre la physiopathologie de la Pemphigoïde mais aussi d'émettre des hypothèses sur les mécanismes de rechute et enfin d'identifier des nouvelles voies de contrôle de l'auto-immunité après traitement par Rituximab.

---

**MOTS CLES** : Auto-immunité, Rituximab, Lymphocyte B

---

#### **JURY**

Membres : Guenounou Moncef, PUPH, Reims  
Dieu Bernard, PH, Rouen  
Favennec Loic, PUPH, Rouen  
Musette Philippe, PUPH, Rouen

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 18 Octobre 2016