



**HAL**  
open science

# Place de l'immunohistochimie C3D/C4D sur tissus fixes et inclus en paraffine dans le diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes

Julie Breton

► **To cite this version:**

Julie Breton. Place de l'immunohistochimie C3D/C4D sur tissus fixes et inclus en paraffine dans le diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01896809

**HAL Id: dumas-01896809**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01896809>**

Submitted on 16 Oct 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# PLACE DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE C3D/C4D SUR TISSUS FIXES ET INCLUS EN PARAFFINE DANS LE DIAGNOSTIC DES DERMATOSES BULLEUSES AUTO-IMMUNES

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE **DOCTEUR EN MÉDECINE**  
DIPLOME D'ÉTAT

Julie BRETON  
[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE  
Le 12 octobre 2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

- Présidente du jury :
  - Mme la Professeure Nathalie STURM
- Membres :
  - Mme le Docteur Nicole PINEL, co-directrice
  - M. le Professeur Laurent DANIEL
  - M. le Docteur Nicolas MACAGNO, co-directeur
  - Mme la Professeure Marie-Thérèse LECCIA
  - M. le Docteur Hugo GIL



# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>5</b>
<b>SERMENT D'HIPPOCRATE</b> .....	<b>7</b>
<b>ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE</b> .....	<b>8</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>12</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>14</b>
<b>ETAT DES CONNAISSANCES</b> .....	<b>15</b>
<b>I - INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>II - LES DERMATOSES BULLEUSES AUTO-IMMUNES</b> .....	<b>17</b>
<b>II.1 Classification</b> .....	<b>17</b>
<b>II.2 Physiopathologie</b> .....	<b>19</b>
II.2.1 Structure histologique de la peau normale : rappel .....	19
II.2.2 Les différents systèmes de cohésion de la peau .....	20
II.2.3 Les cibles antigéniques .....	20
II.2.3.1 Pemphigus vulgaire.....	20
II.2.3.2 Pemphigoïde bulleuse .....	22
II.2.4 La réponse immune à médiation humorale .....	24
II.2.4.1 Pemphigus vulgaire.....	24
II.2.4.2 Pemphigoïde bulleuse .....	24
II.2.5 Pathogénie des lésions bulleuses .....	25
II.2.5.1 Pemphigus vulgaire.....	25
II.2.5.2 Pemphigoïde bulleuse .....	26
II.2.6 Le système du complément : rappel .....	28
<b>II.3 Démarche diagnostique et thérapeutique</b> .....	<b>30</b>
II.3.1 Diagnostic clinique .....	30
II.3.1.1 Lésions élémentaires : rappel .....	30
II.3.1.2 Manifestations cliniques du pemphigus vulgaire et de la pemphigoïde bulleuse .....	30
II.3.2 Modalités thérapeutiques .....	31
II.3.2.1 Pemphigus vulgaire.....	31
II.3.2.2 Pemphigoïde bulleuse .....	31

II.3.3 Diagnostic histologique.....	32
II.3.3.1 Conditions de réalisation des biopsies cutanées.....	32
II.3.3.2 Pemphigus vulgaire.....	33
II.3.3.3 Pemphigoïde bulleuse.....	34
II.3.4 Place de l'immunofluorescence directe.....	35
II.3.4.1 Gold standard ?.....	35
II.3.4.2 Pemphigus vulgaire.....	36
II.3.4.3 Pemphigoïde bulleuse.....	36
II.3.5 Diagnostic biologique et place de l'immunofluorescence indirecte.....	37
II.3.5.1 Pemphigus vulgaire.....	37
II.3.5.2 Pemphigoïde bulleuse.....	37
II.3.6 Place de l'immunohistochimie.....	38
<b>ARTICLE .....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET ANNEXES .....</b>	<b>54</b>

## REMERCIEMENTS

Un grand merci à tous les membres du jury :

- Au président du jury, le Professeur Nathalie Sturm, ma chef de service. Merci pour votre pédagogie, pour les connaissances que vous m'avez transmises et votre encadrement tout au long de mon internat.
- A mon directeur de thèse, le Docteur Nicolas Macagno, merci de vous être déplacé, de votre patience et de votre aide précieuse tout au long de la préparation du travail présenté ce jour.
- A ma directrice de thèse, le Docteur Nicole Pinel, merci pour votre aide dans la préparation de ce travail et pour votre enseignement au cours de mon internat.
- A Monsieur le Professeur Laurent Daniel, merci de vous être déplacé, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci pour votre disponibilité et votre soutien. Merci également de m'avoir prêté des cas provenant de Marseille.
- A Monsieur le Docteur Hugo Gil, merci de t'être rendu disponible dans le cadre de ce travail. Merci pour ton aide, merci de nous transmettre tes connaissances avec ta bonne humeur communicative.
- A Madame le Professeur Marie-Thérèse Leccia, d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Merci pour votre temps et votre considération.

Un immense merci à ma famille et à mes amis :

- A mon mari, merci de m'avoir tant soutenue pendant ces longues années d'études, merci de faire partie de ma vie depuis 14 ans. Je n'attend qu'une chose c'est de fonder une famille avec toi, je t'aime.
- A mes parents, pour leur soutien sans faille, rien n'aurait été possible sans vous. Je vous aime.
- A mon frère et ma sœur et leurs conjoints respectifs, merci d'avoir toujours veillé sur moi, je vous aime.

- A ma belle famille, merci pour votre soutien, rien n'aurait été possible sans l'icône de Pchara sous mon lit, l'eau de fleur d'oranger et les bons petits plats libanais pour me remonter le moral.
- A Alexia, « ma famille de Grenoble », merci pour tous ces moments passés ensemble. Merci de m'avoir tant soutenue dans les moments difficiles. Tu es une amie exceptionnelle. Je t'aime.
- A Charlotte, on s'est rencontrées en 2<sup>ème</sup> année de médecine et on ne s'est plus jamais quittées jusqu'à ce que tu deviennes mon témoin de mariage. Je t'aime.
- A Yohan, merci pour tous ces bons moments passés pendant mon externat à Marseille. Qu'est ce qu'on a pu rire tous les trois, heureusement que vous étiez là.
- A ma cousine Sophie, merci pour toutes ces journées de révisions passées main dans la main, ça nous a unies à jamais. Je t'aime.

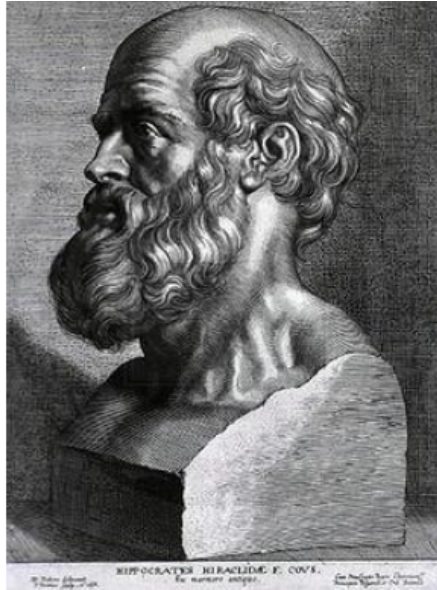
Un grand merci à mes co-internes, merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Un grand merci également :

- Au Docteur Hervé Sartelet, pour votre précieux soutien pendant mon internat, votre patience, votre écoute et votre aide pour mon mémoire.
- A tous les médecins du service pour leur qualité d'enseignement et leur encadrement.
- Aux Professeur Sylvie Lantuejoul et Elisabeth Brambilla qui m'ont accueilli dans le service au début de mon internat. Merci pour les connaissances que vous m'avez transmises en pathologie thoracique.
- A nos techniciennes et secrétaires, merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse.
- A Laurence et Edwige, merci de m'avoir tant aidée sur le plan des techniques de ma thèse, merci pour votre efficacité.
- Au service d'Anatomie Pathologique de Chambéry, j'ai beaucoup aimé mon semestre passé aux côtés du Docteur Jean-Jacques Roux, des Docteurs Dienny et Pocachard et des secrétaires et techniciennes du service.
- A Guillaume, ton aide a été précieuse pour mon mémoire, merci pour les moments passés ensemble en foetopathologie.



## SERMENT D'HIPPOCRATE



## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

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

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

# ENSEIGNANTS À L'UFR DE MEDECINE



Doyen de la Faculté : **Pr. Patrice MORAND**  
Année 2017-2018

CORPS	NOM-PRENUM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOULLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie

PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie générale
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZIABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie

PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU - PH	LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie

PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérard	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUÏ Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale

MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

## ABRÉVIATIONS

**DBAI** : dermatose bulleuse auto-immune

**JDE** : jonction dermo-épidermique

**PB** : pemphigoïde bulleuse

**PV** : pemphigus vulgaire

**IFD** : immunofluorescence directe

**IFI** : immunofluorescence indirecte

**Dsg** : desmogléine

**Ig** : immunoglobuline

**EC** : extracellulaire

## RÉSUMÉ

Le diagnostic de dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) repose sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques. Un examen en immunofluorescence directe (IFD) positif est souvent indispensable en raison du caractère parfois non spécifique attribué aux aspects histologique et clinique. Comme cet examen n'est pas toujours disponible et qu'il requiert des conditions spécifiques de fixation, un examen en immunohistochimie (IHC) sur tissus fixés en formol et inclus en paraffine pourrait représenter une alternative intéressante. Plusieurs études se sont intéressées à l'utilité de la détection IHC du C3d et du C4d dans le diagnostic de DBAI sans parvenir aux mêmes conclusions.

Nous avons analysé la valeur diagnostique de cette technique dans le pemphigus vulgaire (PV) et la pemphigoïde bulleuse (PB) dans une étude rétrospective bicentrique comprenant 42 cas de PB, 17 cas de PV, et 15 cas témoins.

Parmi les 42 biopsies de PB examinées, 30 (71%) présentaient une positivité pour le C3d et 34 (81%) pour le C4d. Sur les 17 échantillons de PV analysés, 8 (47%) présentaient une positivité pour le C3d et 9 (53%) pour le C4d. Tous les cas témoins étaient négatifs pour le C3d et le C4d. Pour le diagnostic de PB, la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) ont été évaluées à 71%, 100%, 100%, 55,5% pour le C3d et à 81%, 100%, 100%, 65% pour le C4d. Pour le diagnostic de PV, ces dernières ont été évaluées à 47%, 100%, 100%, 62,5% pour le C3d et 53%, 100%, 100%, 65% pour le C4d.

En raison d'un manque de sensibilité, la détection IHC du C4d et du C3d n'est pas pertinente dans le diagnostic des deux principales DBAI (PB et PV). Seule la détection IHC du C4d présente des performances diagnostiques intéressantes dans la PB et pourrait représenter un outil diagnostique complémentaire quand l'IFD n'est pas disponible. Nos résultats suggèrent que la détection IHC du C3d et du C4d n'est pas assez performante pour remplacer l'IFD.

## ABSTRACT

The diagnosis of auto-immune blistering diseases (AIBD) is based on the combination of clinical and paraclinical criteria, however since clinical and histopathological findings may be non-specific, a positive direct immunofluorescence (DIF) is required for the diagnosis. As DIF is not widely available and requires specific conditions of fixation, an alternative simpler procedure using immunohistochemistry (IHC) on formalin-fixed-paraffin-embedded specimens (FFPE) would be interesting. Several reports have studied the diagnostic value of C3d and C4d IHC for the diagnosis of AIBD, but their results were conflicting.

We investigated the diagnostic value of C3d and C4d IHC in pemphigus vulgaris (PV) and bullous pemphigoid (BP) on a retrospective bicentric cohort encompassing 42 cases of BP, 17 cases of PV, and 15 control cases.

Out of the 42 BP specimens studied, 30 (71%) and 34 (81%) displayed positivity for C3d and C4d, respectively. Amongst the 17 PV specimens, 8 (47%) and 9 (53%) displayed positivity for C3d and C4d, respectively. All control cases were negative for C3d and C4d.

For the diagnostic of BP, C3d and C4d IHC sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV, NPV) were 71%, 100%, 100%, 55,5% and 81%, 100%, 100%, 65%, respectively. For the diagnostic of PV, the diagnostic performance of C3d and C4d IHC were 47%, 100%, 100%, 62,5% and 53%, 100%, 100%, 65%, respectively.

Due to their lack of sensitivity, C4d and C3d IHC are not relevant for the diagnosis of the two main AIBD, namely BP and PV. Only C4d IHC showed interesting diagnostic performances for the diagnosis of BP and could therefore be used as an adjunct diagnostic tool on FFPE notably in cases for which DIF was not available. Our results suggest that the immunohistochemical detection of C3d and C4d lacks diagnostic performance to completely replace DIF.



# ÉTAT DES CONNAISSANCES

## I - INTRODUCTION

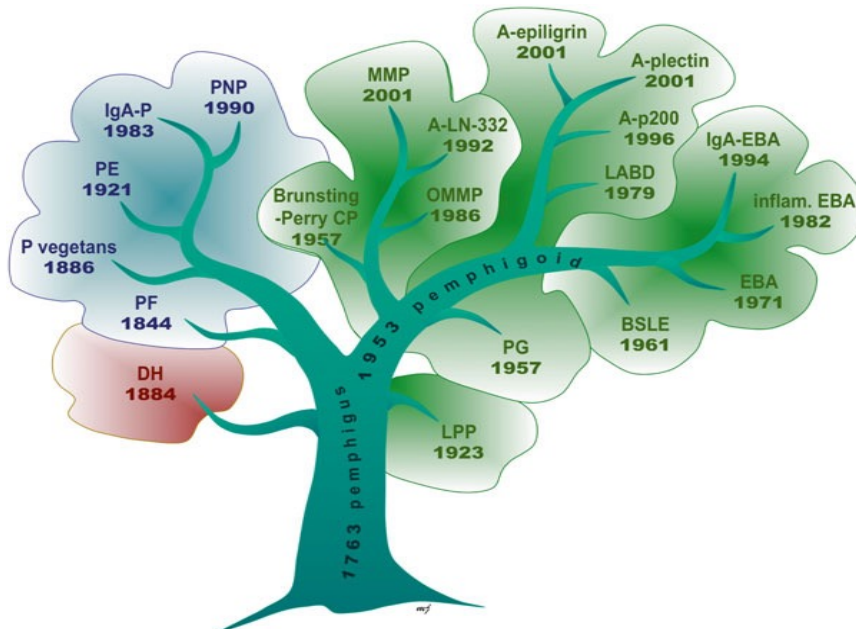
Les dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) sont des maladies inflammatoires cutanées rares (moins de 1 % des patients admis en dermatologie) qui forment un groupe hétérogène dont le pronostic est variable. Le terme de « pemphigus » a été employé pour la première fois en 1763 par François Boissier de la Croix Sauvage et, en 1953, Walter Lever fit la distinction entre le pemphigus de la pemphigoïde bulleuse. Aujourd'hui, on dénombre vingt-deux types de DBAI (1) (figure 1). En raison de leurs fréquences, ce travail s'intéressera plus particulièrement au pemphigus vulgaire (PV) et à la pemphigoïde bulleuse (PB).

Le PV a une incidence de 1,3 nouveau cas par an et par million d'habitants en France. Son incidence est nettement supérieure en Israël où l'on note jusqu'à 16,1 nouveaux cas par an et par million d'habitants. Cela s'explique par un polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH II) présent essentiellement chez les juifs ashkénazes (2). Plusieurs études épidémiologiques ont en effet montré que le PV est fortement associé à la présence de certains groupes HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe II, particulièrement les allèles HLA-DR $\beta$ 1\*0402 et DR $\beta$ 1\*1401. Chez les juifs ashkénazes, l'allèle DR $\beta$ 1\*0402 est prédominant (3).

L'âge moyen de survenue du PV se situe entre 50 et 60 ans (en France : 52 ans) avec une légère prédominance féminine (en France, sexe-ratio F/M : 1,2) (2, 4). Le PV est une dermatose grave avec un taux de mortalité deux à trois fois plus élevé que dans la population générale (4). Avant l'utilisation des corticoïdes, le taux de mortalité était très élevé (70 %). La mortalité a considérablement diminué depuis, passant de 21 % lors de l'introduction de la

corticothérapie à 4 % lors de l'utilisation de thérapeutiques adjuvantes (azathioprine, cyclophosphamide). La mortalité est aujourd'hui essentiellement d'origine iatrogène (3).

La PB est de loin la DBAI la plus représentée avec une incidence de 21,7 nouveaux cas par an et par million d'habitants en France (5, 6). Elle touche préférentiellement les sujets âgés (âge moyen : 82,6 ans) avec une légère prédominance féminine (sexe-ratio F/M : 1,5) (5, 7). Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés : l'âge avancé, la présence de troubles neurologiques (démence, maladie de Parkinson, troubles psychiatriques, épilepsie, pathologies neurovasculaires), la prise chronique de certains traitements (psychotropes, spironolactone, diurétiques de l'anse), un contexte de cancer ou d'hémopathie maligne, mais également de psoriasis ou de diabète de type 1 (8). Enfin, d'un point de vue pronostique, la PB est une maladie grave : le taux de mortalité est en effet considérable chez les patients âgés, en particulier dans les pays occidentaux (10 % à 40 % la première année) (8).



**Figure 1 : Chronologie de découverte des dermatoses bulleuses auto-immunes**, adapté de Jonkman MF, *Autoimmune bullous disease*. Springer. 2016. (DH : dermatitis herpetiformis, PF : pemphigus foliaceus, P vegetans : pemphigus vegetans, PE : pemphigus erythematosus, IgA-P : IgA-pemphigus, PNP : paraneoplastic pemphigus, Brunsting-Perry CP : Brunsting-Perry cicatricial pemphigoid, MMP : mucous membrane pemphigoid, A-LN-332 : anti-laminine 332, OMMP : oral mucous membrane pemphigoid, A-epiligrin : anti-epiligrin, A-plectin : anti-plectin, A-p200 : anti-P200, LABD : linear IgA bullous dermatosis, IgA-EBA : IgA-epidermolysis bullosa acquisita, inflam.EBA : inflammatory epidermolysis bullosa acquisita, EBA : epidermolysis bullosa acquisita, BSLE : bullous systemic lupus erythematosus, PG : pemphigoid gestationis, LPP : lichen planus pemphigoid).

## II - LES DERMATOSES BULLEUSES AUTO-IMMUNES

### II.1 Classification

On distingue les dermatoses bulleuses de cause auto-immune des dermatoses bulleuses non liées à un phénomène d'auto-immunité.

Les DBAI sont secondaires à une atteinte des différents systèmes de jonction de la peau et se divisent en DBAI intra-épidermiques et en DBAI sous-épidermiques résultant respectivement de la formation de bulles au niveau de la jonction interkératinocytaire ou de la jonction dermo-épidermique (JDE) (tableau 1) (9).

<b>DBAI sous-épidermique (jonction dermo-épidermique)</b> Pemphigoïde bulleuse pemphigoïde gravidique pemphigoïde cicatricielle pemphigoïde anti-p200 Dermatite herpétiforme Dermatose à IgA linéaire Épidermolyse bulleuse acquise
<b>DBAI intra-épidermique (jonction interkératinocytaire)</b> Pemphigus vulgaire superficiel (séborrhéique/foliacé) paranéoplasique médicamenteux

Tableau 1 : Classification nosologique des dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI)

Le PV, le pemphigus superficiel, le pemphigus paranéoplasique et le pemphigus médicamenteux sont les principales DBAI intra-épidermiques. Les DBAI sous-épidermiques sont représentées par la PB, la pemphigoïde gravidique, la pemphigoïde cicatricielle, la dermatite herpétiforme, la dermatose à IgA linéaire, et l'épidermolyse bulleuse acquise.

Plus récemment une nouvelle entité a été décrite sous le nom de pemphigoïde anti-p200. Il s'agit d'une DBAI très rare de la JDE dont la présentation clinique est proche de la PB mais

qui s'en distingue par une topographie acrale et une atteinte plus fréquente des muqueuses.

Les anticorps sont dirigés contre la laminine  $\gamma 1$  (10).

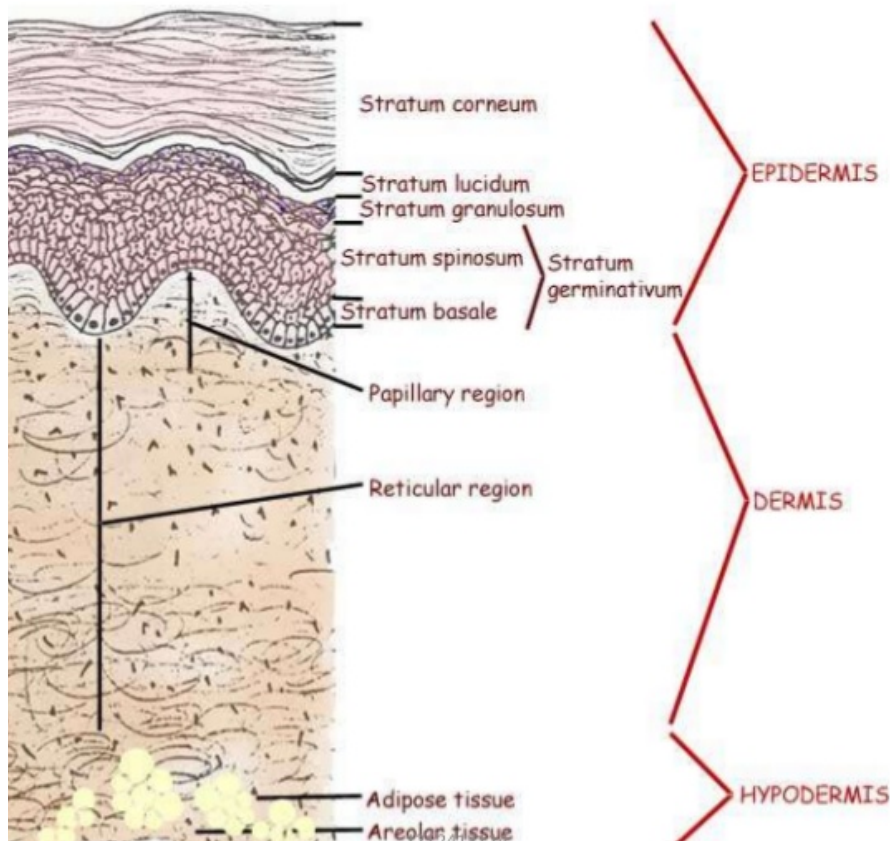
Les dermatoses bulleuses non auto-immunes sont sous-tendues par trois principaux mécanismes : l'acantholyse, la spongiose, et la nécrose kératinocytaire (9). Les étiologies sont multiples et sont illustrées dans le tableau 2.

Congénitales ou héréditaires	Epidermolyses bulleuses héréditaires Incontinentia pigmenti Erythrodermie ichtyosiforme congénitale bulleuse Pemphigus bénin familial, maladie de Hailey-Hailey Maladie de Darier Herpès et varicelle congénitaux
« Hypersensibilité »	Erythème polymorphe Nécrolyse épidermique (syndrome de Lyell) Prurigo bulleux Réactions médicamenteuses (autres que l'érythème polymorphe et le syndrome de Lyell) Photodermatoses allergiques Syndrome de Sweet Syndrome de Wells
Infectieuses	Impétigo bulleux Epidermolyse staphylococcique aigue (syndrome SSS) Syphilis congénitale
Par agents physiques et chimiques	Brûlures Agents caustiques Porphyries Photodermatoses toxiques Eczéma de contact orthoergique
Immunologiques	Eczéma de contact allergique
Autres	Miliaires sudorales Bulles des diabétiques Bulles des hémodialysés Glucagonome (érythème nécrolytique migrateur) Dermatose acantholytique transitoire Pustulose sous-cornée Acrodermatite entéropathique Pathomimie Bulles lors des comas Amyloïdose bulleuse Mastocytose

**Tableau 2 : Classification nosologique des dermatoses bulleuses non auto-immunes**, adapté de Saurat JH, *Dermatologie et infections sexuellement transmissibles*. Elsevier Masson.2009

## II.2 Physiopathologie

### II.2.1 Structure histologique de la peau normale : rappel



**Figure 2 : Structure histologique de la peau normale**, adapté de Laxman Khanal MS, *Skin and Appendages*. Human Anatomy Batch.2011

La peau est constituée de quatre couches : l'épiderme, la JDE, le derme, et l'hypoderme. L'épiderme est un épithélium malpighien stratifié kératinisant constitué principalement de kératinocytes agencés en strates distinctes : cornée (*stratum corneum*), granuleuse (*stratum granulosum*), épineuse (*stratum spinosum*) et basale (*stratum basale*). Le derme est un tissu fibrocollagénique contenant des vaisseaux sanguins, des nerfs, des récepteurs sensitifs mais également les annexes cutanées (follicules pilo-sébacés, glandes sudorales). Enfin, l'hypoderme est la partie la plus profonde constituée principalement de tissu adipeux (11).

## **II.2.2 Les différents systèmes de cohésion de la peau**

La cohésion de l'épiderme et du derme est assurée par deux systèmes d'adhérence : le premier comprend les desmosomes, qui sont responsables de l'adhérence interkératinocytaire permettant la cohésion de l'épiderme ; le second est la JDE, qui comprend, de la superficie vers la profondeur : les hémidesmosomes, les filaments d'ancrage, la lame dense et les fibrilles d'ancrage. Ces dernières permettent l'adhérence entre l'épiderme et le derme sous-jacent. Dans les DBAI, l'altération de ces différents systèmes d'adhérence, secondaire à la fixation d'auto-anticorps, est à l'origine de la perte de cohésion (interkératinocytaire ou dermo-épidermique) entraînant la formation de bulles (12, 13).

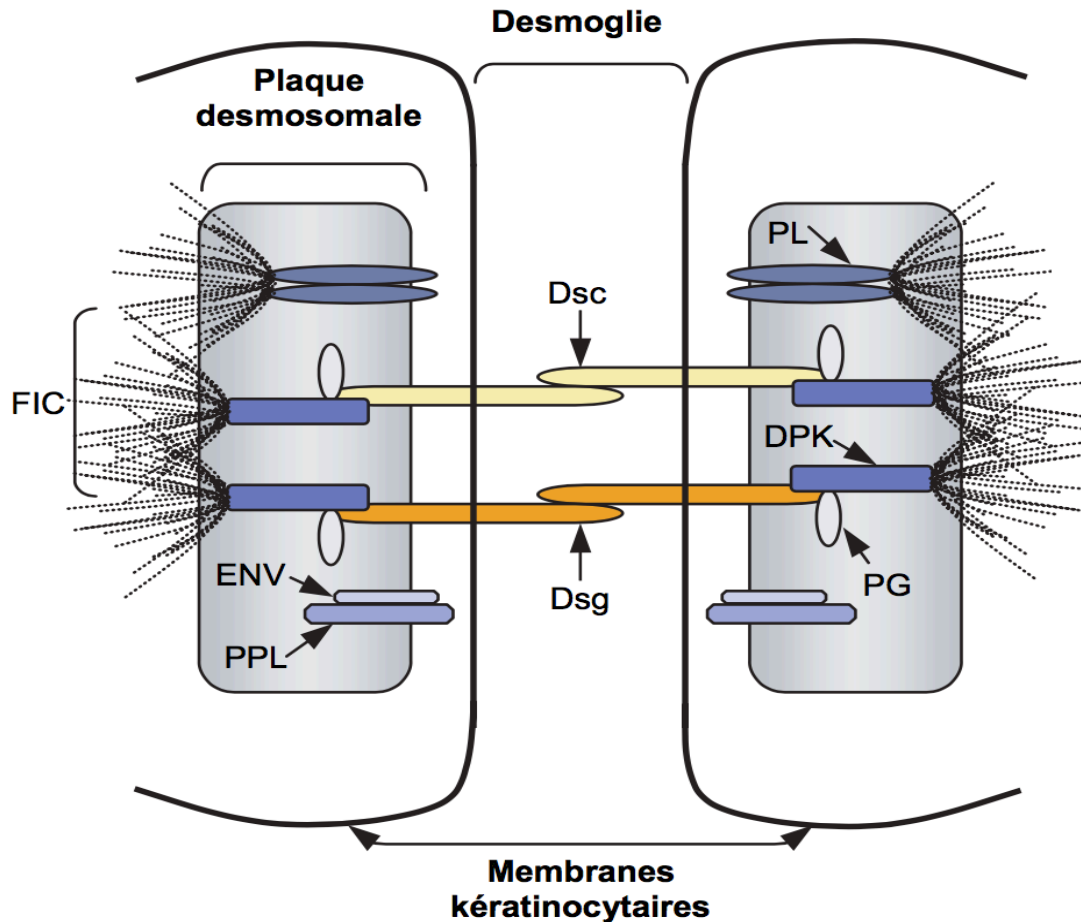
## **II.2.3 Les cibles antigéniques**

Les maladies auto-immunes résultent d'une rupture de la tolérance (état de non-réponse immunitaire à un antigène) aux antigènes du soi. Ce phénomène est la conséquence d'une modification des protéines de structure des desmosomes dans le PV et de la JDE dans la PB.

### ***II.2.3.1 Pemphigus vulgaire***

Les antigènes impliqués dans l'auto-immunité du PV sont les desmoglénines (Dsg). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1, calcium-dépendantes, appartenant à la famille des cadhérines desmosomales. Chez l'homme, il existe quatre isoformes de Dsg (Dsg1 à Dsg4) codées par des gènes distincts localisés sur le chromosome 18q12.1. Elles sont formées d'une région extracellulaire organisée en cinq domaines (EC1 à EC5), d'un segment transmembranaire et d'une région intra-cytoplasmique. Ces protéines adhèrent entre elles dans l'espace interkératinocytaire (ou desmoglie) par des interactions homotypiques (interactions entre protéines homologues) de leurs domaines extracellulaires (EC1 et EC2). Ces domaines EC1 et EC2 amino-terminaux sont le plus souvent ciblés par les auto-anticorps du PV. Les

Dsg sont liées aux filaments intermédiaires de cytokératine *via* les protéines de la plaque desmosomale (plakoglobine et desmoplakine) (4, 14) (figure 3).



**Figure 3 : Organisation moléculaire du desmosome**, adapté de Mouquet H, Gilbert D et al. *Avancées moléculaires dans la physiopathologie des maladies bulleuses auto-immunes*. Ann Dermatol Venerol. 2005 ; 132 : 231-42. Le desmosome assure l'adhésion cellulaire entre deux kératinocytes adjacents. Il est constitué, d'une part, de glycoprotéines transmembranaires appartenant à la famille des cadhérines desmosomales (les desmoglénines (Dsg) et les desmocollines (Dsc)) qui forment la desmoglie et, d'autre part, de protéines cytosoliques, les plakines (les desmoplakines (DPK), la plectine (PL), l'envoplakine (ENV) et la périplakine (PPL)) et la plakoglobine (PG) qui forment la plaque desmosomale. Les cadhérines desmosomales interagissent entre-elles par leur extrémité N-terminale, avec la PG et les DPK par leur domaine cytosolique. Les filaments intermédiaires de cytokératine (FIC) sont fixés à la plaque desmosomale *via* des interactions avec les DPK et la PL.

### II.2.3.2 Pemphigoïde bulleuse

Les antigènes impliqués dans l'auto-immunité de la PB sont deux protéines des hémidesmosomes qui permettent l'adhérence à la membrane basale, BPAG1 (BP 230) protéine intracellulaire et BPAG2 (BP 180) protéine transmembranaire.

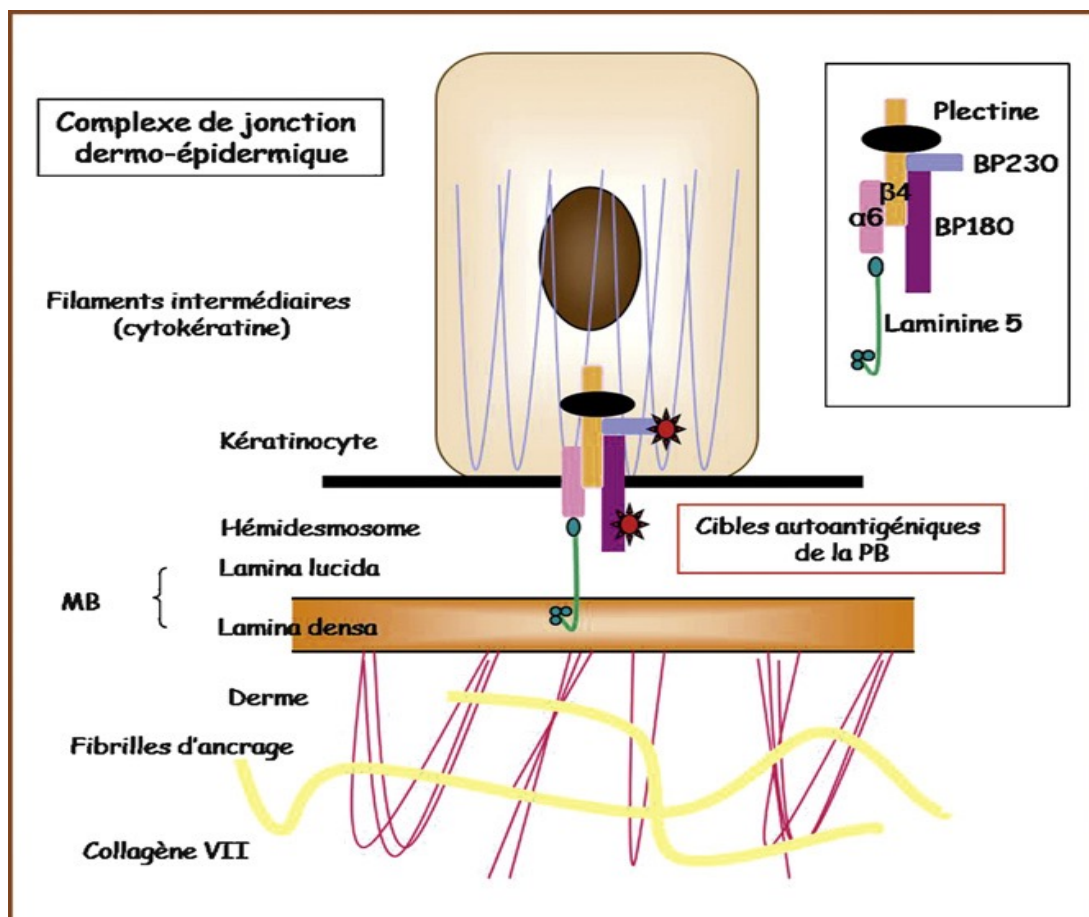
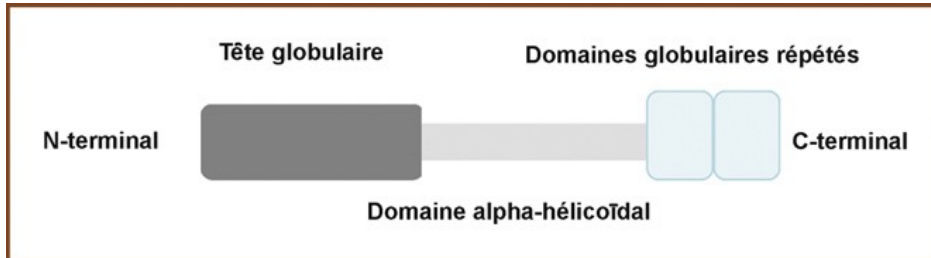


Figure 4 : Principaux composants des hémidesmosomes et de la jonction dermo-épidermique, adapté de Doffoel-Hantz V, Cogné M et al. *Physiopathology of bullous pemphigoid*. Ann Dermatol Venereol. oct. 2009 ; 740-747, 748.

Dans la JDE, plectine et BP230 interviennent dans la connexion des filaments intermédiaires de cytokératine à la membrane basale. De leur côté, BP180 et l'intégrine alpha-6 beta 4 sont reliées à la matrice extracellulaire *via* la laminine 5 (13, 15, 16) (figure 4).

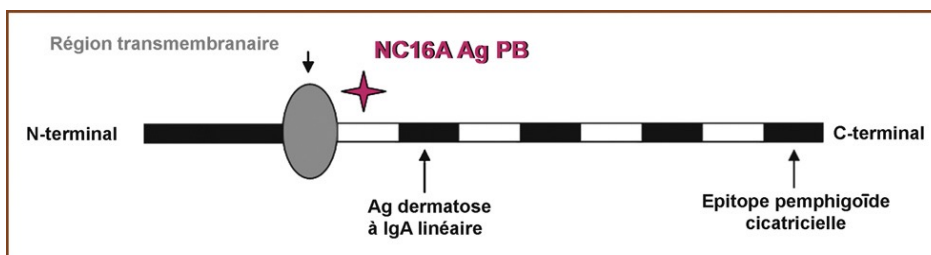


BP230 est localisée dans la partie interne de l'hémidesmosome, au niveau de la plaque d'ancrage des filaments intermédiaires. La molécule est formée de deux domaines globulaires séparés par un domaine alpha-hélicoïdal (figure 4, 5).



**Figure 5 : Organisation structurale de la protéine BP 230**, adapté de Doffoel-Hantz V, Cogné M et al. *Physiopathology of bullous pemphigoid*. Ann Dermatol Venereol.oct. 2009 ; 740-747, 748.

BP180 est formée d'une succession de domaines collagéniques et non collagéniques. Son extrémité N-terminale se situe dans l'hémidesmosome alors que son extrémité C-terminale se situe dans la partie inférieure de la *lamina lucida* et participe à la formation des filaments d'ancrage qui relient les hémidesmosomes à la *lamina densa*. Le domaine immunogénique dominant reconnu par les sérums des malades atteints de PB est adjacent à la membrane plasmique des hémidesmosomes et il est appelé NC16A. Il est constitué de 16 acides aminés (figure 4, 6).



**Figure 6 : Organisation structurale de la protéine BP180**, adapté de Doffoel-Hantz V, Cogné M et al. *Physiopathology of bullous pemphigoid*. Ann Dermatol Venereol.oct. 2009 ; 740-747, 748.

En résumé, les antigènes impliqués dans l'auto-immunité du PV sont les Dsg, protéines assurant l'adhérence interkératinocytaire au niveau des desmosomes alors que ceux impliqués dans la PB sont les protéines BP180 et BP230 assurant la cohésion dermo-épidermique au niveau des hémidesmosomes.

## **II.2.4 La réponse immune à médiation humorale**

Dans les maladies auto-immunes, la perte de « tolérance immunitaire » envers des antigènes endogènes a pour conséquence la formation d'auto-anticorps.

### ***II.2.4.1 Pemphigus vulgaire***

Au cours du PV, les anticorps pathogènes appartiennent de façon prédominante à la sous-classe d'immunoglobuline (Ig) G4. Ils reconnaissent préférentiellement les épitopes situés au niveau de la partie distale extracellulaire des Dsg, domaines EC1 et EC2 amino-terminaux (région impliquée dans l'adhérence cellule-cellule) (14, 17).

### ***II.2.4.2 Pemphigoïde bulleuse***

Au cours de la PB, les anticorps pathogènes appartiennent de façon prédominante aux sous-classes IgG1 et IgG4. Ces IgG sont dirigées le plus souvent contre le domaine le plus immunogène de BP180 : le domaine NC16A. Il existe également une immunité spécifique dirigée contre BP230 et, dans près de 60 % des cas, il s'agit d'une réactivité IgG dirigée contre l'extrémité C-terminale de cette molécule (15).

## II.2.5 Pathogénie des lésions bulleuses

Au cours des maladies auto-immunes, la fixation d'auto-anticorps sur leurs cibles antigéniques entraîne la formation de complexes immuns. Ces complexes immuns peuvent éventuellement activer le système du complément selon la nature de l'Ig impliquée. Ce dernier a été initialement décrit comme ayant un rôle clé dans la physiopathologie du PV et de la PB.

### II.2.5.1 Pemphigus vulgaire

Dans le PV, il est aujourd'hui établi que le mécanisme de formation des bulles est indépendant du complément, bien que l'immunofluorescence directe (IFD) montre souvent des dépôts de C3 à la surface des cellules épithéliales, suggérant une activation du complément *in situ*. En effet, dans un modèle animal, le transfert d'anticorps IgG du PV chez des souris néonatales dépourvues de la fraction C5 du complément, ou dont le complément était déficient (par prétraitement avec le facteur du venin de cobra), a entraîné le développement de bulles cutanées acantholytiques (17). La responsabilité des auto-anticorps dans l'induction de l'acantholyse a été démontrée expérimentalement *in vitro* et *in vivo*. En effet, chez les mères ayant un pemphigus actif, le passage transplacentaire des auto-anticorps induit transitoirement un PV chez le nouveau-né.

Les mécanismes responsables de la perte de cohésion intercellulaire sont multiples. L'encombrement stérique est un des mécanismes potentiels par interaction directe entre les auto-anticorps et les résidus du domaine extracellulaire amino-terminal des Dsg qui médient la trans-adhésion et la cis-adhésion des desmosomes. L'interférence des auto-anticorps dans l'assemblage des desmosomes constituerait un autre mécanisme par internalisation et dégradation des Dsg 3 qui ne sont pas encore intégrées dans les desmosomes. Enfin, des voies de signalisation intracellulaire sont impliquées dans la pathogénèse du PV faisant

intervenir des interactions complexes entre la protéine kinase activée par un mitogène p38 (p38MAPK), la protéine RhoA, la protéine kinase C (PKC), le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), la plakoglobine et c-Myc (17).

#### ***II.2.5.2 Pemphigoïde bulleuse***

Au cours de la PB, le complément joue un rôle important dans la formation des bulles. En effet, après rupture de l'autotolérance, les auto-antigènes BP180 et BP230 sont présentés *via* le CMH II exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T CD4+. À la reconnaissance de ces épitopes, les lymphocytes T CD4+ déclenchent la libération de diverses cytokines et activent ainsi les lymphocytes B qui, à leur tour, produisent des auto-anticorps. La fixation de ces auto-anticorps sur leurs cibles aboutit à la formation de complexes immuns responsables de l'activation du complément. Ceci induit la dégranulation des mastocytes par des dérivés des fragments C3a et C5a du système complément. Les mastocytes activent alors le recrutement des polynucléaires neutrophiles qui sécrètent ensuite des enzymes protéolytiques, principalement l'élastase, la collagénase, les activateurs du plasminogène, la plasmine ainsi que la métalloprotéase matricielle 2 (MMP)-2, la MMP-9 et la MMP-13. Ces dernières dégradent BP180 et BP230 et entraînent ainsi une perte de cohésion de la JDE, à l'origine de la formation des bulles (18).

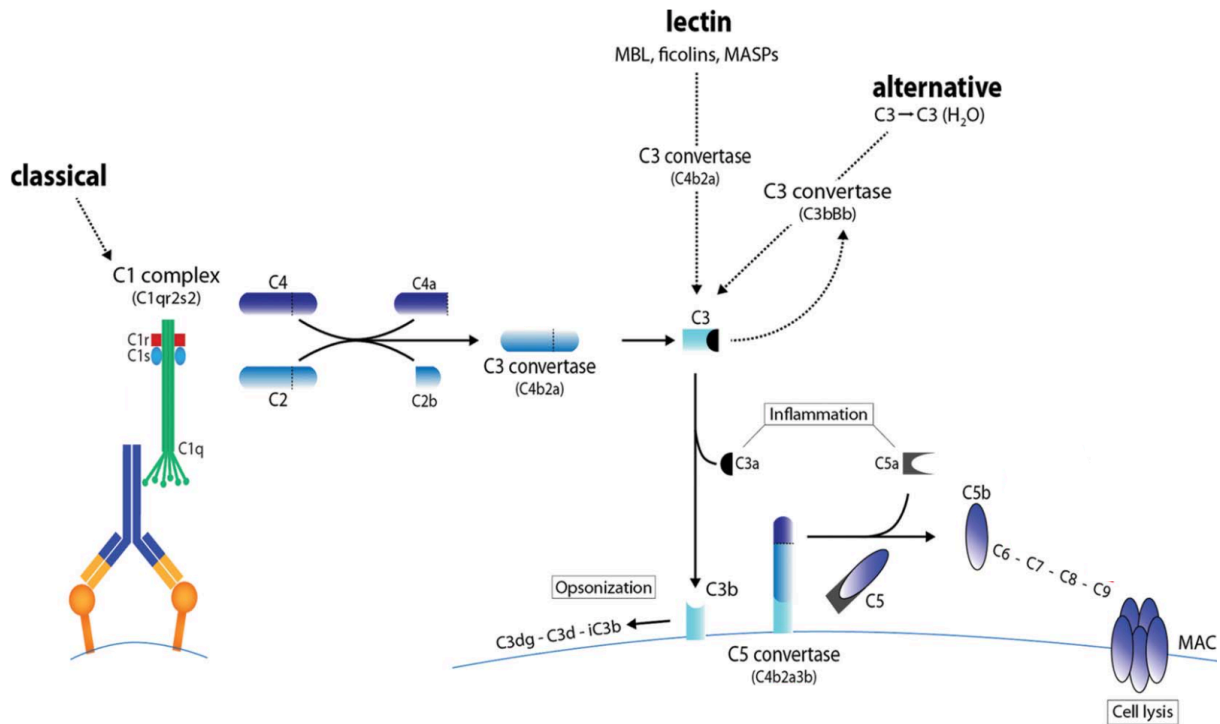
Cependant, il a été récemment démontré qu'il existerait un mécanisme indépendant du complément et, en particulier, un effet pathogène direct des auto-anticorps. Ceci a pu être suggéré chez l'homme par deux cas de PB montrant des dépôts d'IgG sans dépôts concomitants de C3 en IFD. Kitajima *et al.* ont confirmé cette hypothèse *in vitro* : après traitement par des anticorps IgG de patients atteints de PB, ils ont noté une diminution considérable de la protéine BP180 dans les kératinocytes cultivés. Cette diminution augmentait le processus de dissociation des cellules et donc de formation de bulle. De plus, le

groupe de Tsuruta *et al.* a rapporté que les anticorps IgG BP, ainsi que leurs fragments F(ab')<sub>2</sub> ou Fab, induisent l'internalisation de BP180 dans les kératinocytes cultivés. Les mêmes constatations ont été faites *in vivo* chez l'animal par Shimizu *et al.*

Il a de plus été démontré que, dans les cas de PB négatives pour le C3 en IFD, la sous-classe IgG4 est prédominante. Cette dernière présente un potentiel très limité pour activer le complément et serait ainsi impliquée dans la formation de bulles par internalisation et dégradation de BP180 comme évoqué dans les études *in vitro* (17).

En résumé, dans la PB les lésions bulleuses peuvent résulter d'une activation du complément ou de l'effet pathogène direct des auto-anticorps alors que dans le PV le mécanisme de formation des bulles est toujours indépendant du complément.

## II.2.6 Le système du complément : rappel



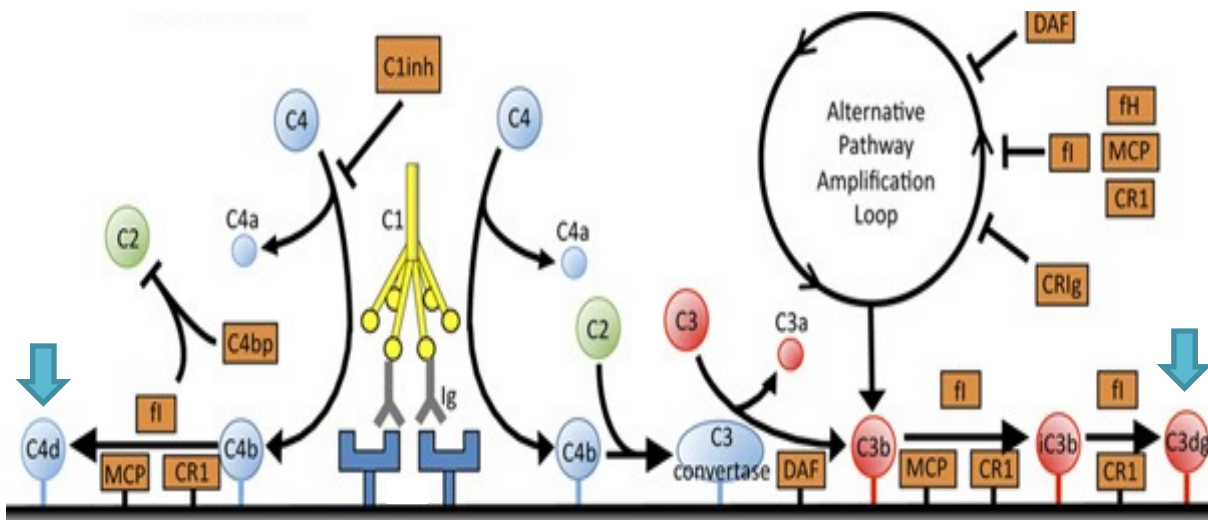
**Figure 7 : Les trois voies d'activation du complément**, adapté de Meyer S, Leusen JH et al. *Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer*. *Mabs* 2014 ; 6 : 1133–1144. (MBL: mannose binding lectin, MASPs : mannose-binding-lectin-associated serine proteases, MAC: membrane attack complex).

Il existe trois voies d'activation du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines qui convergent toutes vers le clivage de la protéine C3. L'activation de la voie classique a lieu grâce à la fixation de la protéine C1q à l'un de ses ligands, qui sont principalement les anticorps IgG1, IgG3 et IgM fixés aux surfaces microbiennes ou sur des complexes immuns. Dans la voie des lectines, la protéine de reconnaissance est une protéine MBL (*Mannose Binding Lectin*) ou une ficoline dont la liaison à des carbohydrates de micro-organismes initie cette voie. La voie alterne n'est pas initiée par une liaison spécifique-protéine. Elle est au contraire activée en permanence par un processus appelé le « *tick-over* » correspondant à l'hydrolyse spontanée du C3.

Dans les trois voies, la protéine C3 est clivée en fragments C3a et C3b sous l'action d'une C3 convertase, identique dans les voies classique et des lectines (C4bC2a) mais différente dans la

voie alterne (C3bBb) (19). Le C3b issu de ce clivage participe à son tour à la formation d'une C5convertase permettant le clivage de C5 en C5a et C5b. Le C3a et le C5a libérés au cours de ces différentes étapes sont de puissantes anaphylatoxines capables de recruter des cellules inflammatoires sur le site de l'activation du complément. Enfin, le C5b, en s'associant aux protéines C6, C7, C8 et C9, forme le complexe d'attaque membranaire, étape finale commune aux trois voies (20) qui a pour rôle une lyse osmotique de la cellule (21).

Cependant, le complément est un système peu spécifique qui requiert des mécanismes de régulation indispensables pour éviter une agression des cellules hôtes. Le facteur I, enzyme de la famille des protéases à sérines, nous intéresse particulièrement puisqu'il permet le clivage de C3b et C4b en C3d et C4d, inactifs sur le plan catalytique, sous l'action de cofacteurs (MCP, CR1, FH, C4BP) (figure 8) (22).



**Figure 8 : Mécanismes de régulation du complément : formation du C3d et du C4d**, adapté de Stites, E., Le Quintrec, M. & Thurman, J. M. *The complement system and antibody-mediated transplant rejection*. J. Immunol. 2015 ; 195, 5525–5531. (DAF: decay-accelerating factor, fH: factor H, fi: factor I, MCP: membrane cofactor protein, C4bp: C4b-binding protein, CR1: complement receptor 1).

## II.3 DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

### II.3.1 Diagnostic clinique

#### II.3.1.1 Lésions élémentaires : rappel

La lésion élémentaire du PV et de la PB est une bulle, formation liquidienne superficielle de contenu clair ou séro-hématique de taille supérieure à 5 mm qui peut siéger sur la peau ou les muqueuses. Elle se distingue de la vésicule, de plus petite taille (2 mm de diamètre), et de la pustule dont le contenu est purulent. Cependant, certaines DBAI (dermatite herpétiforme, pemphigoïde bulleuse) peuvent être accompagnées de vésicules et, inversement, il existe aussi des formes bulleuses de dermatoses vésiculeuses (herpès, zona, eczéma). On peut également évoquer une dermatose bulleuse devant des érosions cutanées post-bulleuses, des érosions des muqueuses voire un vaste décollement épidermique (aspect de « linge mouillé sur la peau ») (1, 12).

#### II.3.1.2 Manifestations cliniques du pemphigus vulgaire et de la pemphigoïde bulleuse

Caractéristiques cliniques	Pemphigoïde bulleuse	Pemphigus vulgaire
Âge de survenue	>70 ans	50-60 ans
Prodromes	Prurit ++	Non
Aspect des bulles	Tendues	Flasques
État peau péri bulleuse	Urticarienne ou érythémateuse ou eczématiforme	Saine
Signe de Nikolsky*	Absent	Présent
Topographie des lésions	Tronculaire, racine et face de flexion des membres, face antéro-interne des cuisses et abdomen Symétriques+++	Plis de flexion, cuir chevelu, zones de frottement
Lésions des muqueuses	Rare	+++inaugurale (lésions buccales érosives++)

Tableau 3 : Principales caractéristiques cliniques du pemphigus vulgaire et de la pemphigoïde bulleuse

\* décollement cutané provoqué par un frottement appuyé sur une zone de peau saine traduisant un clivage intra-épidermique.



## **II.3.2 Modalités thérapeutiques**

Le traitement comporte des mesures propres à toute maladie bulleuse : bains antiseptiques, pansements gras, hydratation compensant les pertes hydro-électrolytiques et nutrition hypercalorique compensant les pertes protéiques.

### ***II.3.2.1 Pemphigus vulgulaire***

Le traitement d'attaque vise à contrôler la maladie : corticothérapie générale à forte dose : prednisone (1 à 1,5 mg/kg par jour) puis diminution progressive des doses. Un traitement d'entretien de plusieurs années est souvent nécessaire pour obtenir une rémission complète. Il peut être associé à un traitement immunosuppresseur (azathioprine, cyclophosphamide ou ciclosporine) en cas de résistance au traitement par corticoïdes. Il a été récemment démontré que le Rituximab (anticorps monoclonal ciblant le CD20) permettait de réduire la dose, la durée de la corticothérapie et un meilleur contrôle de la maladie (12).

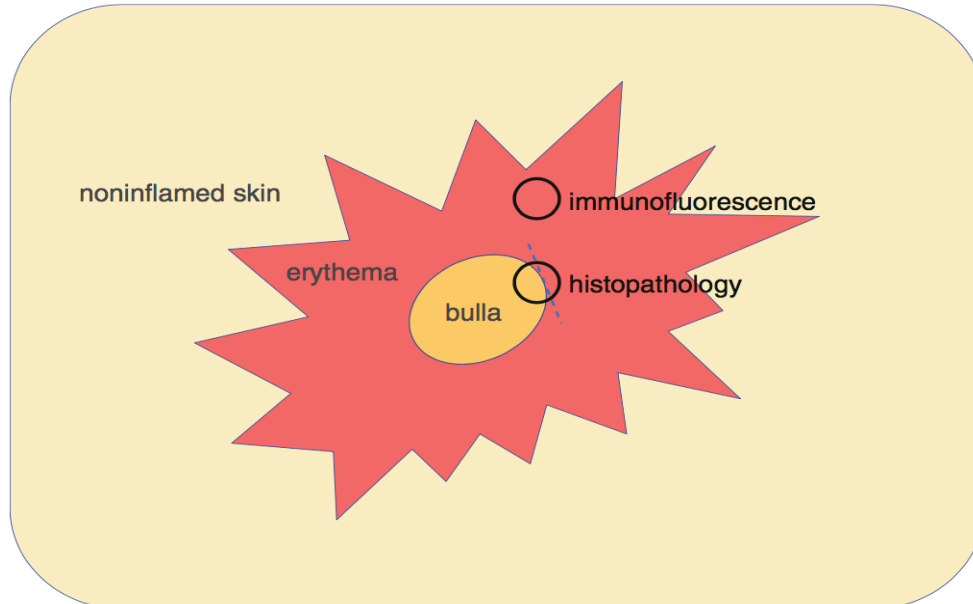
### ***II.3.2.2 Pemphigoïde bulleuse***

Le traitement repose également sur une corticothérapie (durée moyenne : 6 à 12 mois). Elle peut être locale – propionate de clobetasol (20 à 40 g par jour) avec une efficacité similaire à la corticothérapie générale mais une meilleure tolérance – ou générale – prednisone (0,5 à 0,75 mg/kg par jour) –, suivie d'une décroissance progressive durant plusieurs mois dans les deux cas. Des traitements immunosuppresseurs (méthotrexate, azathioprine, mycophénolate mofétil) sont indiqués en cas de résistance à la corticothérapie (< 5 % des cas) ou en cas de rechutes multiples lors de la décroissance de la corticothérapie (12).

## II.3.3 Diagnostic histologique

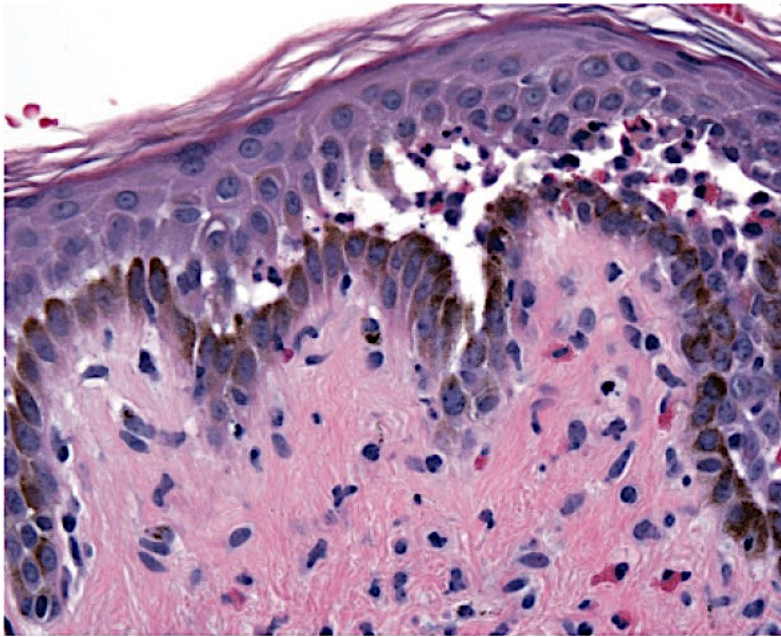
### II.3.3.1 Conditions de réalisation des biopsies cutanées (figure 9)

Le punch biopsique doit être réalisé sur une lésion récente et mesurer au moins 4 mm de diamètre. Le prélèvement doit comporter 2/3 de bulle et 1/3 de peau péri-bulleuse et doit être transporté fixé dans du formol tamponné à 4 % pour l'analyse histologique. Un second prélèvement biopsique est réalisé en peau périlésionnelle pour l'immunofluorescence directe et doit être transporté dans des conditions spécifiques : conservé à l'abri du dessèchement dans une compresse largement imbibée de sérum physiologique ou mis dans une goutte de gel cryoprotecteur en milieu réfrigéré ou dans une solution de Michel, ce qui est couramment réalisé (1).



**Figure 9 : Sièges de la biopsie pour l'immunofluorescence directe et l'analyse histologique devant une suspicion de PB, adapté de Jonkman MF. *Autoimmune bullous disease*. Springer. 2016.**

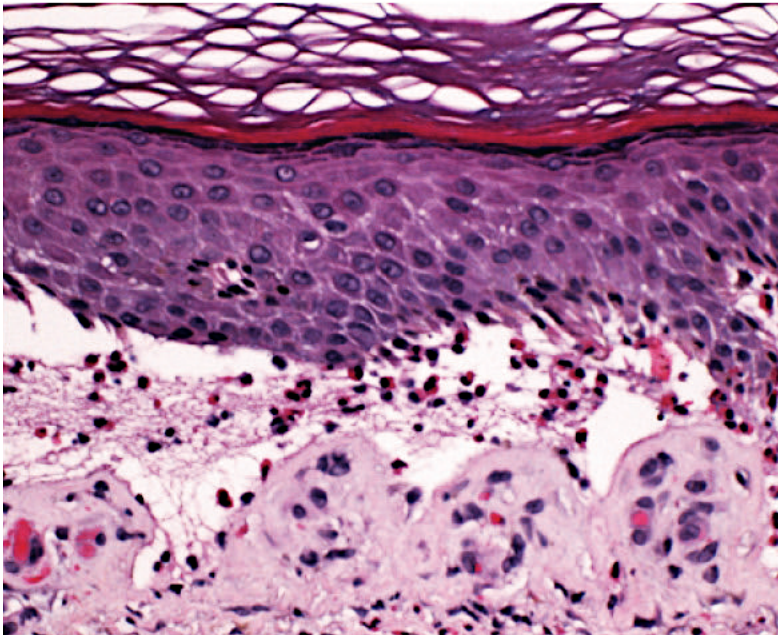
### II.3.3.2 Pemphigus vulgaire



**Figure 10 : Aspect histologique du pemphigus vulgaire : bulle intra-épidermique suprabasale**, adapté de Hammers CM, Stanley JR. *Mechanisms of disease: pemphigus and bullous pemphigoid*. *Annu Rev Pathol*. 2016 ; 11:175–97.

L’histologie est caractéristique, montrant un clivage profond suprabasal par acantholyse à l’origine d’une séparation des kératinocytes, sans nécrose. Ce clivage est dentelé, suivant la basale, et peut se prolonger dans les follicules pileux. Les kératinocytes acantholytiques sont basophiles et arrondis prenant un aspect de « pierres tombales » alignées au-dessus de la basale. Le derme est le siège d’infiltrats périvasculaires le plus souvent discrets et polymorphes avec présence de polynucléaires éosinophiles mais sans image de vascularite. Les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles peuvent cependant être plus nombreux et migrer vers l’épiderme. Les lésions débutantes de PV montrent la présence de polynucléaires éosinophiles associés à une discrète spongiose. Le toit de la bulle peut ne pas être visible en cas de décollement cutané provoqué par la réalisation d’une biopsie ou si le prélèvement biopsique concerne une érosion post bulleuse. La persistance de la couche basale est essentielle au diagnostic de PV (9).

### II.3.3.3 Pemphigoïde bulleuse



**Figure 11 : Aspect histologique de la pemphigoïde bulleuse : bulle sous-épidermique contenant des polynucléaires éosinophiles**, adapté de Hammers CM, Stanley JR. *Mechanisms of disease: pemphigus and bullous pemphigoid*. *Annu Rev Pathol*. 2016 ; 11:175–97.

L'aspect histopathologique typique est celui d'une bulle sous-épidermique à toit intact. Ce dernier est formé par toute l'épaisseur de l'épiderme qui apparaît orthokératosique sans nécrose kératinocytaire ni acantholyse. La cavité de la bulle contient des sérosités et des éléments inflammatoires polymorphes à type de lymphocytes, macrophages et polynucléaires éosinophiles. Le plancher dermique est mis à nu et occupé par des infiltrats périvasculaires sans image de vascularite. Dans les lésions débutantes, on observe une margination des éosinophiles le long de la basale, avec ou sans discret clivage sous-épidermique. Dans les lésions tardives, on voit une nécrose du toit avec ré-épithélialisation sous-jacente. Il existe enfin des formes rares à prédominance de polynucléaires neutrophiles (9).

En résumé, au niveau histologique la principale différence observée entre le PV et la PB est la localisation de la bulle : intra-épidermique dans le PV et sous-épidermique dans la PB.

### II.3.4 Place de l'immunofluorescence directe

Après son transport au laboratoire dans un milieu spécifique, le fragment destiné à l'IFD est rapidement congelé dans un gel cryoprotecteur. La biopsie cutanée congelée est ensuite coupée à l'aide d'un cryostat. Les coupes obtenues sont alors déposées sur des lames et conservées à 0°C. L'observation des lames nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence et est pratiquée dans l'obscurité (23).

#### II.3.4.1 Gold standard ?

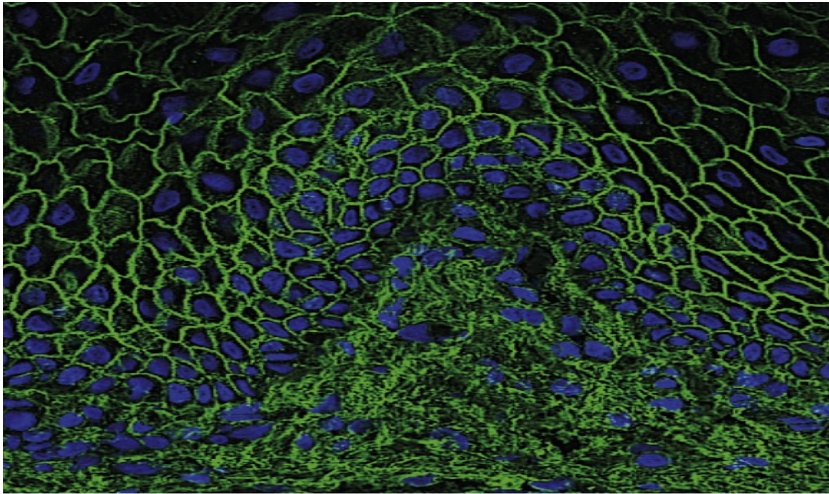
	IFD sur coupes congelées		IFI		Histologie	
	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
<b>PV</b>	90-100 % <sup>24, 25, 26</sup>	99 % <sup>26</sup>	75-100 % <sup>31</sup>	91,8-100 % <sup>31</sup>	66-90 % <sup>25,26</sup>	100 % <sup>26</sup>
<b>PB</b>	87-100 % <sup>27, 28</sup> 77,2* % <sup>30</sup>	98 % <sup>29</sup> 94,9* % <sup>30</sup>	72,7 % <sup>30</sup>	93,7 % <sup>30</sup>	76,3 % <sup>30</sup>	81,3 % <sup>30</sup>

**Tableau 4 : Synthèse des valeurs de sensibilité et spécificité de l'immunofluorescence directe (IFD) sur coupes congelées, de l'immunofluorescence indirecte (IFI) et de l'histologie observées dans la littérature**

\*Biopsies cutanées provenant de toutes localisations.

L'IFD reste le *Gold Standard* dans le diagnostic de PB et de PV. En effet, les études récentes comparant la sensibilité et la spécificité de l'IFD sur coupes congelées, de l'histologie, de l'immunofluorescence indirecte (IFI) et de l'IFD sur paraffine démontrent qu'il s'agit d'un outil précis et nécessaire au diagnostic de DBAI (30, 32, 33, 34). Bien que les valeurs de sensibilité et de spécificité de l'IFD soient élevées dans ces deux pathologies, il existe des cas faussement négatifs attribués au non-respect du site approprié de la biopsie, au milieu de transport utilisé, à un défaut de rigueur dans la technique ou encore au délai de lecture des lames ayant pour conséquence une diminution de la fluorescence. Il existe également des cas faussement positifs attribués à une fluorescence parasite (23). Le diagnostic repose ainsi sur un faisceau d'arguments incluant la présentation clinique, l'histologie, l'IFD et l'IFI.

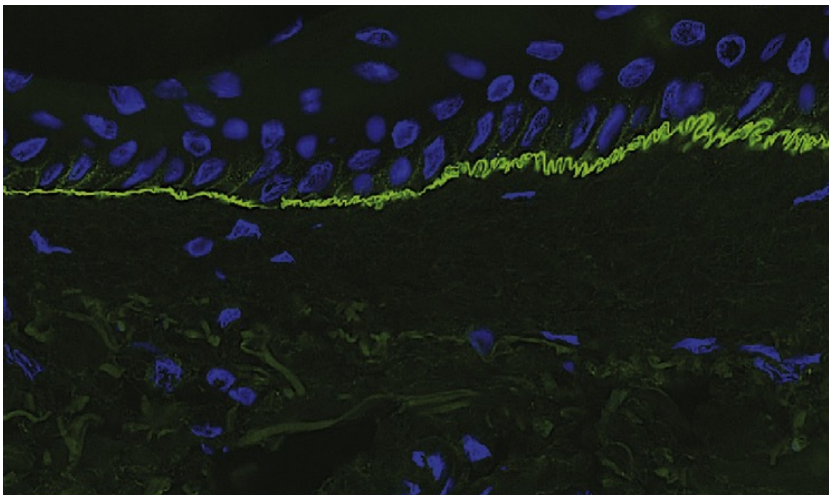
#### ***II.3.4.2 Pemphigus vulgaire***



**Figure 12 : Immunofluorescence directe : dépôt interkératinocytaire en résille d'IgG observé dans le pemphigus vulgaire, adapté de Jonkman MF. *Autoimmune bullous disease*. Springer. 2016**

L'IFD montre des dépôts intercellulaires d'IgG et de C3 dans l'épiderme ou dans l'épithélium des muqueuses lésées, dont l'aspect est caractéristique en « résille » ou « mailles de filet ». Ces dépôts sont observés sur toute la hauteur ou sur la moitié inférieure de l'épithélium (9).

#### ***II.3.4.3 Pemphigoïde bulleuse***



**Figure 13 : Immunofluorescence directe : dépôt linéaire d'IgG observé le long de la jonction dermo-épidermique dans la pemphigoïde bulleuse, adapté de Jonkman MF. *Autoimmune bullous disease*. Springer. 2016**

L'aspect typique en IFD est celui d'un dépôt fin et linéaire en liseré continu d'IgG et/ou de C3 le long de la jonction dermo-épidermique (9).

En résumé, les dépôts observés en IFD au cours du PV sont situés au niveau de l'espace interkératinocytaire alors qu'ils sont localisés au niveau de la JDE dans la PB.

### **II.3.5 Diagnostic biologique et place de l'immunofluorescence indirecte**

#### ***II.3.5.1 Pemphigus vulgaire***

L'examen du sérum en IFI standard retrouve des anticorps circulants anti-substance intercellulaire de classe IgG dont le titre est corrélé à l'activité de la maladie. L'immunotransfert et la technique ELISA déterminent les antigènes reconnus par les auto-anticorps circulants (desmogléine 3 ± desmogléine 1 au cours du PV) (12).

#### ***II.3.5.2 Pemphigoïde bulleuse***

Une hyperéosinophilie est fréquemment retrouvée sur la numération formule sanguine. L'examen du sérum en IFI standard retrouve des anticorps circulants anti-membrane basale (de classe IgG). Ils sont détectables dans 80 % des sérums (titre non lié à la sévérité ou à l'étendue de la maladie). L'immunotransfert et la technique ELISA déterminent les antigènes reconnus par les auto-anticorps circulants (BPAG1 et BPAG2) (12).

En résumé, la principale différence entre le PV et la PB au niveau biologique est la présence d'une hyperéosinophilie observée dans la PB qui est absente dans le PV. De plus, l'examen du sérum en IFI retrouve des anticorps circulants anti-substance intercellulaire dans le PV et des anticorps anti-membrane basale dans la PB.

### II.3.6 Place de l'immunohistochimie

Comme nous l'avons décrit précédemment, la fraction C3d du complément, produit de dégradation inactif du C3b, est formée à partir de la voie classique ou alterne du complément alors que la fraction C4d, produit de dégradation inactif du C4b, est formée uniquement à partir de la voie classique du complément. On sait aujourd'hui que C3d et C4d restent fixés à la surface activée par le complément par une liaison covalente stable et durable tandis que les autres composants de la cascade du complément disparaissent. Ils sont ainsi considérés comme deux marqueurs d'activation *in situ* du complément et facilement mis en évidence en immunohistochimie sur paraffine ou en immunofluorescence sur coupe congelée (35, 36).

Les dépôts de C3d et C4d ont fait l'objet de multiples études concernant les transplantations d'organes solides, notamment cardiaques, rénales et pulmonaires. Ils servent à l'heure actuelle de marqueurs diagnostiques et pronostiques dans le rejet humoral (37, 38, 39). En 2008, Magro et Dyrsen ont été parmi les premiers à étudier ces dépôts sur des coupes immunohistochimiques en paraffine dans des pathologies cutanées inflammatoires. Ils ont alors montré que la détection immunohistochimique C3d/C4d pouvait être un outil diagnostique intéressant en complément de l'IFD, voire même susceptible de la remplacer. Cependant, leur étude princeps présentait plusieurs limites, notamment un nombre limité d'échantillons et une absence de confirmation de leurs résultats par d'autres études (40). Par la suite, un faible nombre d'études s'est intéressé à cette problématique de façon plus spécifique dans les DBAI (41, 42, 43). Les résultats contradictoires de ces études ne permettent pas à l'heure actuelle d'affirmer que l'immunohistochimie C3d/C4d puisse remplacer l'IFD.

Nous avons étudié l'intérêt de la détection immunohistochimique du C3d/C4d sur paraffine dans le diagnostic de PB et de PV en comparaison à l'actuel *Gold Standard* représenté par l'IFD (cf. article).



**Diagnostic value of C3d and C4d immunohistochemistry on Fixed-Paraffin-Embedded biopsy for autoimmune blistering diseases**

Julie Breton<sup>1,2</sup>, Nicole Pinel<sup>2</sup>, Marie-Thérèse Leccia<sup>1,3</sup>, Laurent Daniel<sup>4,6</sup>, Hugo Gil<sup>1,2</sup>, Nathalie Sturm<sup>1,2</sup>, Nicolas Macagno<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Université Joseph Fourier, UFR Médecine et Pharmacie, F-38706 La Tronche, France

<sup>2</sup> Département d'Anatomie et Cytologie pathologiques (DACP), CHU Albert Michallon, 38043 Grenoble, France

<sup>3</sup> Service de Dermatologie, CHU Albert Michallon, 38043 Grenoble, France

<sup>4</sup> Université Aix Marseille, UFR Médecine secteur Timone, 13385 Marseille, France

<sup>5</sup> Aix Marseille Université, INSERM, Marseille Medical Genetics (MMG), Marseille, France

<sup>6</sup> Aix Marseille Université, APHM, CHU Timone, Anatomie Pathologique et Neuropathologie, Marseille, France

**Correspondence to :** [jbreton@chu-grenoble.fr](mailto:jbreton@chu-grenoble.fr)

Département d'Anatomie et Cytologie pathologiques (DACP), CHU Albert Michallon, 38043 Grenoble, France

**Short title :** C3d/C4d immunohistochemistry in autoimmune bullous dermatosis

**Word count :** abstract 294 words, text 3315 words

**Number of references :** 32

**Number of table and figures :** 10

**List of abbreviations**

BP : bullous pemphigoid

PV : pemphigus vulgaris

AIBD : auto-immune blistering diseases

DIF : direct immunofluorescence

DEJ : dermo-epidermal jonction

IHC : immunohistochemistry

IIF : indirect immunofluorescence

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

FFPE: formalin-fixed-paraffin-embedded

## INTRODUCTION

Auto-immune blistering disorders (AIBD) are auto-immune cutaneous diseases characterized by the formation of blisters and ulcerations on the skin and mucosa. AIBD are the consequence of auto-antibodies targeted to specific structural components of the skin, which ultimately cause the loss of keratinocytes cohesion, responsible for the clinical signs.

Bullous pemphigoid (BP) and pemphigus vulgaris (PV) account for the two most frequent AIBD (13, 44, 45). In the past carrying high mortality rates, the introduction of corticosteroid therapy in these two AIBDs has improved their prognosis. The lethal risk does still exist, but is now mainly related to opportunistic infections that occur due to the prolonged immunosuppressive treatments (2, 7).

The diagnosis of AIBD is based on a combination of clinical and paraclinical criteria. A skin biopsy is required to support the diagnosis: histopathological examination on standard coloration will allow the distinction of AIBDs according to the mechanism involved and the area of the epidermis that is splitted. The direct immunofluorescence (DIF) exam allows the detection of the immunoglobulin and complement deposits which are required for the diagnosis. Auto-antibodies against dermo-epidermal junction (DEJ) are responsible for subepidermal blistering in BP while in case of PV, the auto-antibodies are directed against interkeratinocyte's proteins, causing acantholysis. A positive DIF, sampled on perilesional skin, is required for the diagnosis because clinical and histopathological features alone are not entirely specific. The deposits are linear and composed of IgG and C3 on the DEJ in BP, and intercellular, on the keratinocytes membranes in a "chicken-wire" pattern in PV. Detection of auto-antibodies in the serum by indirect immunofluorescence (IIF) may complete the diagnostic assessment (3, 8, 9, 12).

The complement system plays a significant role in the pathogeny of auto-immune disorders, particularly AIBDs (46). Indeed, auto-immune diseases result from the rupture of tolerance to

self-antigens, leading to the formation of auto-antibodies and immune complexes. Those immune complexes are responsible for activation of the complement, initially described as an essential actor in the pathophysiology of PV and BP (15). The C3 component is routinely detected in DIF for the diagnosis of AIBD. However, studies are limited regarding the diagnostic value of the complement when it is detected using an immunohistochemical method on formalin-fixed-paraffin-embedded (FFPE), in particular for the diagnosis of AIBD. However, this method of detection could represent an interesting alternative because DIF shows several inconveniences: the need for a second biopsy, the transport in a specific fixation medium (Michel's liquid), a specialized technical treatment (on frozen sections), the necessity to observe the DIF slides on a fluorescence microscope, and a relatively high cost. The fluorescence and antigenic reactivity can be lost when the slides are stored without fast interpretation. Finally, in certain circumstances, only a FFPE skin biopsy is available to the pathologist and DIF exam can not be performed, in particular when AIBD has not been clinically suspected (23). Previous reports studied the detection of complement by immunohistochemistry (IHC), but these studies had several limitations: a limited number of samples, contradictory results and inhomogeneous cohorts that did not specifically target AIBDs (40, 42).

The aim of our study was to analyze the expression of C3d and C4d in cases of PV and BP by IHC on FFPE samples to assess their diagnostic value compared to DIF, the current gold standard.

## METHODS

### CASE SELECTION

A bicentric, retrospective, morphological and, immunohistochemical study was performed on tissue samples collected from pathology departments of two french centers (Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes (CHUGA) and Centre Hospitalier Universitaire Timone Marseille (Timone)). The skin biopsies data were retrieved from the laboratory databases (infologic Diamic and TDHC softwares). Between 2010 and 2018, we retrieved the samples of 74 patients, encompassing 36 specimens from Timone (26 cases of PB (72%), 9 cases of PV (25%) and 1 control case (3%)) and 38 specimens from CHUGA including 16 cases of PB (42%), 8 cases of PV (21%) and 14 control cases (37%) (table 1, 2, 3, 4). The control cases (n=15) encompassed 9 healthy skin biopsies, 2 cases of Grover's disease, 4 cases of bullous dermatosis with negative DIF (2 cases of mechanical blisters, 1 case of inflammatory blistering disease unspecified and one case of arterioveinous insufficiency blistering disease). An informed consent was obtained from all participants.

### HISTOLOGY

Before IHC investigation, all tissue samples were reviewed morphologically by two pathologists to confirm the histopathological features of BP and PV. The diagnosis of AIBD was based on the association of typical clinical setting, histology, and a positive DIF. On routinely stained skin sections, the diagnosis of BP was suspected if a subepidermal blister was present (subepidermal blister or cleft associated with a dermal infiltrate comprising numerous eosinophils) whereas the diagnosis of PV was suspected if an intra-epidermal blistering was present (epidermal and follicular acantholysis, sparing the basilar keratinocytes which harbor a characteristic "aligned tombstones" appearance) (figure 1). DIF examination was considered positive for PV when IgG and/or C3 deposits on the membranes of epidermal

keratinocytes were present throughout the entire epidermis or in the surface or deep layer of the epidermis. It was positive for BP if linear deposits along the DEJ on the corresponding frozen peri-lesional skin specimens were noted.

## IMMUNOHISTOCHEMISTRY

The IHC study was performed on 3 µm FFPE skin section using Benchmark XT autostainer. Anti-C3d antibody was used at CHUGA and anti-C4d antibody at Timone. After deparaffinization, antigens were retrieved by a CC1 pretreatment (Cell Conditioning 1 - Roche - Ref 05279801001 (Tris/Borate/EDTA pH 8.4)) for 90 minutes at 98°C. Anti-C3d antibody (Anti-C3d antibody - Rabbit monoclonal[E28-P] - Abcam - Ref. ab136916 - 1/50) was applied for 2h at 37°C. Revelation was performed using an Ultraview Alkaline Phosphatase Red Detection kit (Ventana Medical System - Roche - Ref. 05269814001) with amplification (Amplification Kit - Roche - Ref. 05266114001). At the same time, after deparaffinization and short tampon CC1 pre-treatment step, anti-C4d antibody (anti-C4d antibody, Rabbit monoclonal, DB Biotech clone A24T, DB 107 - 1/100) was applied for 32 minutes followed by application of a revelation kit detection (Ultraview Universal DAB, Ventana Medical Systems, ref 052698060001).

A kidney biopsy obtained from a patient with antibody-mediated allograft rejection was used as positive control for C4d antibody (peri-tubular capillary staining) (47). A tissue sample obtained from tonsils was used as positive control for C3d antibody (lymphoid follicles staining) (42). Negative controls were performed by omitting primary antibody. C3d and C4d deposits were analysed for each pathological and control cases by two pathologists. A linear immunohistochemical staining along the DEJ adjacent to the blister was required for the diagnosis of BP and, as described by previous studies, deposits on the surface membrane of the basal keratinocytes could be associated (48). Indeed, deposition of C3d or C4d within the blister cavity (at the roof or the base of the blister) without concomitant

deposition at the DEJ on perilesional skin has been described in several non-AIBD conditions and is not considered as positive result (figure 2) (43). The intensity of deposits was variable but, as the control cases included did not present any deposits at all, even focal and slight deposits of C3d and C4d along the DEJ adjacent to the blister were considered positive for the diagnosis of BP. Intercellular deposits were required for the diagnosis of PV, and this staining pattern could be associated with staining of the acantholytic keratinocytes within the blister cavity (figure 2) (48).

A consistent staining of dermal elastic fibers was noted in all cases of study and served as internal control.

## STATISTICAL ANALYSIS

Analyses were performed using SPSS software package, version 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Qualitative data were described using number and percent. Quantitative data were described using range (minimum and maximum), quartiles and median. Comparison between groups was performed with the non-parametrical Kruskal-Wallis test for quantitative variables and with the Fischer's exact test for qualitative variables. 95% confidence intervals were obtained using the Wilson method. Significance of the obtained results was judged at the 5% level.

## RESULTS

### BULLOUS PEMPHIGOID

Of 42 BP biopsies studied, 30 (71%) and 34 (81%) displayed C3d and C4d positivity, respectively (table 5) (figure 3). Deposits of C3d and C4d along the DEJ were concomitants with deposition of the membrane of basal keratinocytes in 18 cases for C4d (53%,  $p=0,006$ ) and in 14 cases for C3d (46.5%,  $p=0,003$ ). Deposits on the roof, floor or bullous cavity co-existed with the linear labeling along the DEJ in 32 BP biopsies for C4d (94%,  $p<0,001$ ) and 26 for C3d (86.5%,  $p<0,001$ ). Of the C3d and/or C4d negative cases, 5 (36%) had IIF positive, 3 (21%) had negative IIF and serological status was not available for 6 cases (table 6). All BP examined had concomitant IgG and C3 deposits on the frozen skin specimen by DIF.

### PEMPHIGUS VULGARIS

Of the 17 PV biopsies, 8 (47%) and 9 (53%) displayed positivity for C3d and C4d, respectively, (table 5) (figure 3). Concomiting with « intercellular » deposition, staining for acantholytic keratinocytes was observed in the blister area in 8 cases for C4d (89%,  $p=0.0004$ ) and 6 cases for C3d (75%,  $p=0.002$ ). Amongst C3d and/or C4d negative cases, 4 (40%) had positive IIF, 2 (20%) had negative IIF and serological status was not available for 4 cases (40%) (table 6). All but one case of PV had concomitant IgG and C3 DIF deposits: only one case displayed C3 deposition (on the membranes of epidermal keratinocytes) without IgG.

### CONTROL CASES

All control cases displayed negativity for C3d and C4d (100%).



## DIAGNOSTIC VALUE

The C3d sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were evaluated at 71%, 100%, 100%, 55,5% respectively in BP and 47%, 100%, 100% and 62,5% in PV respectively. Similarly, C4d sensitivity, specificity, PPV and NPV were evaluated at 81%, 100%, 100% and 65% respectively in BP and 53%, 100%, 100% and 65% in PV (table 7).

The serological data (IIF and/or ELISA) were available in 29 of 42 BP and 11 of 17 PV included in our study. Twenty-three of 29 BP (79%) and 11 of 17 PV (63%) with available serological tests had positive IIF.

## DISCUSSION

DIF is currently an important ancillary tool for the diagnosis of AIBD (49). The pathological examination of the skin biopsy using standard coloration carries a great diagnostic value but some cases display equivocal histological findings for which DIF and/or IIF are mandatory to confirm the diagnosis (50). This is the case of evolved blistering lesions that have resulted in skin erosions, which are less specific on histological grounds. A recent study showed high sensitivity (77.2%) and specificity (94.9%) for DIF examination compared to standard histology (76.3% and 81.3% respectively) and IIF (72.7% and 93.7% respectively) for the diagnosis of BP (30). DIF examination has disadvantages, notably the need of fresh frozen tissue transported in a specific way and a specialized laboratory. The examination of the slides requires a fluorescence microscope and the slides can not be stored for a long time. In some cases, fresh tissue is not available for DIF and only a formalin-fixed biopsy is provided to the pathological laboratory for analysis, especially when AIBD was not clinically suspected (23). Performing DIF on FFPE after antigen retrieval is possible but reduces the sensitivity of the technique (50-60%) compared to traditional DIF performed on frozen sections (32, 33).

The IHC detection of complement on FFPE tissues as an alternative technique to DIF for the diagnosis of AIBD has not been well studied. Magro and Dyrsen *et al.* were among the first to be interested in the immunohistochemical detection of C3d/C4d and its value for the diagnosis of AIBD on FFPE. Their study found invariable concordance between C3d IHC and DIF for the diagnosis of BP (40). In their study, all of the 17 cases of BP analyzed displayed positivity for C3d. Nearly similar results were found by Pfaltz *et al.* and Hanan *et al.*, with a very high sensitivity for the diagnosis (97% and 90%, respectively) of BP (43, 51), but not by Glauser *et al.* that found lower sensitivity (37.3%) (albeit they demonstrated that C3d sensitivity was higher (83%) in a subgroup of patients with clinically evident blisters and/or

circulating autoantibodies) (42). In our cohort, we found a sensitivity of 71% for the diagnosis of BP using C3d IHC. This lack of sensitivity can be explained by several causes, notably selection biases with variable inclusion of patients with clinical blisters and/or active disease. Recent studies have shown that at least one fifth of BP patients may not have an obvious clinical blister at diagnosis (52, 53). Seventy-five percent of the patients included in Pfaltz *et al.* study had clinical and/or histologic blisters, which contrasts with Glauser *et al.* study in which the cohort consisted of unselected patients for which a diagnosis of BP was rendered independently of the presence of a clinical and/or histological blister (42, 43). In our study, all the BP cases studied presented histological blisters, supporting the hypothesis advanced by Glauser *et al.* that patients with blisters display more deposits of C3d. Another parameter that may have influenced our results is the age of the samples: the other cohorts have a study period of 1 to 4 years whereas we have included patients over a period of 8 years. IHC for C3d revelation was performed using an Ultraview Alkaline Phosphatase Red Detection kit in our cohort and it has been established that this technique can decrease the detection sensitivity of several antibodies. This is suggested by Magro *et al.* and Hanan *et al.* who used DAB revelation kit detection in their study and found high sensitivity values and by Glauser *et al.* study that used a red detection kit and found low sensitivity values. This is also suggested by the difference of sensitivity observed between C3d (71%) and C4d (81%) performed respectively at CHUGA (red revelation kit) and at Timone (DAB revelation kit) in BP diagnosis. However Pfaltz *et al.*, who used a red revelation kit found high sensitivity values (97%).

Our results show that the detection of C3d on FFPE samples using IHC provides poor diagnostic value in PV (sensitivity = 47%). This was consolidated by other studies that found significantly lower sensitivity values (7% and 21% in Hanan *et al.* and Pfaltz *et al.* studies

respectively) (43, 51). Magro and Dyrsen found more negative results in C3d IHC detection in PV than BP, however they were able to detect intercellular deposits in 82% of cases (40).

The detection of C4d by IHC displayed a sensitivity of 53% for the diagnosis of PV. These results are conflicting with recent studies by Villani *et al.* and Magro and Dyrsen *et al.* which were able to detect intercellular deposits in 77% and in 82% of PV cases, respectively (40, 48). Biases linked to the cohort size are possible since the study by Magro *et al.* reported the highest levels of sensitivity but with a smallest number of PV cases (40). This is certainly not the only bias, as the number of cases in the cohort by Villani *et al.* was larger. A different procedure may also cause sensitivity variation, indeed antibodies and reagents used in our study (anti-C4d antibody, Rabbit monoclonal, DB Biotech clone A24T, DB 107 - 1/100 applied for 32 minutes) are different from those used by Magro *et al.* (anti-C4d antibody, Rabbit polyclonal Alpco-BI- RC4D, Salem, NH - 1/25 applied for 25 minutes) and Villani *et al.* (anti-C4d antibody, Rabbit polyclonal, Biomedica Gruppe Austria-BI- RC4D- 1/30 applied for 30 minutes).

The blister formation mechanism is independent of complement in PV and this has been proven by several studies using either the transfer of IgG antibodies from pemphigus into neonatal mice lacking C5, or in neonates with complement deficiency, both of which lead to the development of acantholytic skin blisters (17). It is well established that anti-IgG4 antibodies do not activate complement. This immunoglobulin subclass of antibodies is present in more than 70% of patients with active disease (antibody level being correlated with activity of the disease) (45, 54, 55). We might have included a greater number of clinically active PV than Villani *et al.* which may have ultimately lead to less complement deposits. This hypothesis seems unlikely as all our C4d-negative cases using IHC displayed C3 deposition on DIF examination, suggesting a direct lack of sensitivity of IHC technique or a problem with the sampled skin area, which is normally different for the histological and the DIF

examination.

One of our C4d using IHC negative cases had only C3 deposits without IgG on DIF examination. This finding can be explained by the lack of sensitivity of the commercial anti-human IgG preparations for IgG4 (56).

A study by Zang *et al.* using IHC, showed the strong role of IgG4 in the pathogenesis of PV: their study emphasized that IgG4 detection by IHC is a valuable ancillary tool for the diagnosis of PV, particularly for the active forms. Following these results, Hanan *et al.* further demonstrated that the combined analysis of C3d and IgG4 using IHC was even more efficient for the diagnosis of PV which displayed a dissociated (C3d negative/ IgG4 positive) pattern of staining. The results of this study suggested that a combined approach detecting C4d/IgG4 would carry a better diagnostic value than C4d detection alone (51, 57).

For the diagnosis of BP, the detection of C4d by IHC displayed a high sensitivity in our study (81%). Similar results were found by Villani *et al.* and Chandler *et al.* which showed 86% and 70% of sensibility, respectively (41, 48). However the C4d detection showed lower sensitivity (81%) than that of DIF in our study (100%), and also lower than the DIF sensitivity observed in literature (87 to 100%). The specificity of DIF and IHC were equivalent in our study (100% for C4d and 100% for DIF). Specificity was slightly better for C4d than DIF in literature (98%). C4d carried a better sensitivity than IIF for BP diagnosis, based on the available data of our study (81% and 79%, respectively), also in agreement with the results of Villani *et al.* (IIF: 67%) and Eckardt J *et al.* (IIF: 72,7%) (30, 48).

In our study, IIF was also compared with C4d results in PV and C3d results in PV and BP: IIF retained greater sensitivity than C4d in PV (IIF: 63%, C4d: 53%) and greater sensitivity than C3d in BP (IIF: 79%, C3d: 71%) and in PV (IIF: 63%, C3d: 47%). However, as IIF was not carried out on the control cases in our cohort, the exact diagnostic performance of IIF are difficult to integrate. In other studies, IIF sensitivity was 75-100% in PV and 72,5% in BP.

These results are better than those observed in our study for C4d and C3d in the diagnosis of PV (C4d: 53%, C3d: 47%) and slightly greater than C3d results observed in our study in the diagnosis of BP (C3d: 71%) (30, 31).

As described in recent other studies, C3d and C4d deposits observed at DEJ in BP can be associated with deposits on the roof, floor or bullous cavity and on the membrane of basal keratinocytes. Similarly, « intercellular » deposition observed in PV can be associated with a staining for acantholytic keratinocytes (48).

## CONCLUSION

For the diagnosis of the two main autoimmune blistering diseases, namely BP and PV, the immunohistochemical detection of complement (C3d and C4d) on paraffin samples lacks diagnostic performance to be considered as a reliable alternative to DIF in our retrospective cohort. Of note, and only for the diagnostic of BP, our results suggest that the C4d on FFPE carries sufficient sensitivity to represent a good alternative for particular cases for which a frozen sample is not available for DIF. Importantly, further prospective comparative studies are required to allow definitive conclusions on the validity of immunohistochemistry for the routine diagnosis of AIBDs, as numerous factors such as the chronology of the biopsy, the skin area that was sampled and the presence of clinical blisters all have a great impact on complement deposits.

*Authors declare no conflicts of interest.*

**THÈSE SOUTENUE PAR :** Julie BRETON

**TITRE :** PLACE DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE C3D/C4D SUR TISSUS FIXES ET INCLUS EN PARAFFINE DANS LE DIAGNOSTIC DES DERMATOSES BULLEUSES AUTO-IMMUNES

**CONCLUSION :**

Dans notre cohorte rétrospective, la détection immunohistochimique du complément (C3d et C4d) sur tissus fixés et inclus en paraffine ne peut être considérée comme une alternative valable à l'immunofluorescence directe dans le diagnostic des deux principales dermatoses bulleuses auto-immunes représentées par la pemphigoïde bulleuse et le pemphigus vulgaire. Nos résultats suggèrent que la détection immunohistochimique du C4d présente une sensibilité suffisante dans le diagnostic de pemphigoïde bulleuse et représente ainsi une bonne alternative à l'immunofluorescence directe dans les cas où une biopsie congelée n'est pas disponible. Plusieurs autres études prospectives comparatives seront nécessaires pour parvenir à des conclusions définitives sur la validité de l'immunohistochimie dans le diagnostic de dermatoses bulleuses auto-immunes en routine. En effet de nombreux facteurs tels que la chronologie de réalisation et le siège de la biopsie cutanée ainsi que la présence clinique de bulles ont un impact important sur la présence des dépôts de complément.

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**  
Grenoble, le :

**LE DOYEN**



**Pr. Patrice MORAND**

**LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE**



**Pr. Nathalie STURM**  
Chef de Service  
Dpt d'Anatomie & Cytologie Pathologiques  
Pôle de Biologie et de Pathologie  
CHU Grenoble Alpes  
N° RPPS 10002996758

**Pr. Nathalie STURM**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET ANNEXES

1. Jonkman MF. *Autoimmune bullous disease*. Springer. 2016.
2. Kridin K. *Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities*. Immunol. Res. 2018 Apr; 66(2):255-270.
3. Borradori L, Trueb R et al. *Autoantibodies from a patient with paraneoplastic pemphigus bind periplakin, a novel member of the plakin family*. J Invest Dermatol 1998 ; 111, 338-340.
4. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT et al. *Pemphigus*. Nat Rev Dis Primers. 2017 ; 3:17026.
5. Bagci IS, Horvath ON et al. *Bullous pemphigoid*. Autoimmun Rev. 2017; 16: 445–455.
6. Schmidt E, Spindler V et al. *Meeting report of the pathogenesis of pemphigus and pemphigoid meeting in Munich*. J Invest Dermatol. 2017; 137:1199—203.
7. Kridin K. *Subepidermal autoimmune bullous diseases: overview, epidemiology, and associations*. Immunol Res.2018 66:6–17.
8. Bernard P, Antonicelli F et al. *Bullous pemphigoid: a review of its diagnosis, associations and treatment*. Am J Clin Dermatol. 2017 ; 18:513–28.
9. Weschler J, Fraitag S et al. *Histopathologie cutanée non tumorale*. Sauramps medical. Nov 2012.
10. Munsh C, Prey S et al. *Pemphigoïde anti-p200 : réponse spectaculaire à la dapsons*. Ann Dermatol Venereol 2011;138: 739-42.
11. Heath J.W, Stevens A et al. *Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather*. De Boeck, 2<sup>ème</sup> édition. 2008.
12. *Item 110-UE 4 Dermatoses bulleuses auto-immunes*. Ann Dermatol Venereol.2018.
13. Duvert-Lehembre S, Joly P et al. *Les maladies bulleuses auto-immunes*. Rev Médecine Interne. Mar. 2014 ; vol. 35, no. 3, pp. 166–173.
14. Mouquet H, Gilbert D et al. *Avancées moléculaires dans la physiopathologie des maladies bulleuses auto-immunes*. Ann Dermatol Venereol. 2005 ; 132 : 231-42.
15. Doffoel-Hantz V, Cogné M et al. *Physiopathology of bullous pemphigoid*. Ann Dermatol Venereol.oct. 2009; 740- 747, 748.
16. Hammers CM, Stanley JR. *Mechanisms of disease: pemphigus and bullous pemphigoid*. Annu Rev Pathol. 2016 ; 11:175–97.



17. Dainichi T, Chow Z et al. *IgG4, complement, and the mechanisms of blister formation in pemphigus and bullous pemphigoid*. J Dermatol Sci. 2017; 88:265–70.
18. Riani, M. *Rôle de la chimiokine CXCL10 dans la réaction inflammatoire associée à l'autoimmunité: exemple de la pemphigoïde bulleuse*. Diss. 2017.
19. Donnette-le quintrec M. *Facteurs prédictifs de récurrence et de sévérité du syndrome hémolytique et urémique atypique et de la glomérulonéphrite à C3 après transplantation rénale*. Thèse de doctorat. Université René Descartes-Paris V. 2013.
20. Martel, C. *Rôles physiopathologiques du complément dans le syndrome coronarien aigu et implications thérapeutiques*. 2009.
21. Crahes M. *Facteurs du complément et microangiopathie thrombotique rénale : à propos de 57 observations*. Thèse de doctorat. Université de Rouen. 2015.
22. Frimat, M. *Lésions endothéliales liées à un défaut de contrôle du complément: de la génétique du complément au syndrome hémolytique et urémique*. Thèse de doctorat. Université René Descartes-Paris V. 2013.
23. Idrissi H et al. *Apport de L'immunofluorescence directe dans le diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes*. Thèse n°178/12. Décembre 2012.
24. Kanwar AJ, De D. *Pemphigus in India*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2011; 77: 439–449.
25. Hrabovska Z, Jautova J et al. *A study of clinical, histopathological and direct immunofluorescence diagnosis in pemphigus group Utility of direct immunofluorescence*; Bratisl Med J. 2017; 118 (4) 243 – 249.
26. Helander SD, Rogers RS III. *The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes*. J Am Acad Dermatol 1994;30:65-75.
27. Deepthi PK, Santosh CS et al. *Direct immunofluorescence study in autoimmune bullous disorders of skin*. IJBAR.2013; 04 (09):611-618.
28. Deepthi SP, Sulakshana MS et al. *A histomorphological study of bullous lesions of skin with special reference to immunofluorescence*. Int J Curr Res Aca Rev 2015; 3 (3): 29–51.
29. Sardy M, Kostaki D et al. *Comparative study of direct and indirect immunofluorescence and of bullous pemphigoid 180 and 230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of bullous pemphigoid*. J Am Acad Dermatol. 2013;69:748–53.
30. Eckardt J, Eberle FC et al. *Diagnostic value of autoantibody titres in patients with bullous pemphigoid*. Eur J Dermatol 2018; 28: 3-12.

31. Xuan RR, Yang A et al. *New biochip immunofluorescence test for the serological diagnosis of pemphigus vulgaris and foliaceus: A review of the literature*. Int J Womens Dermatol. 2018 Feb 3;4(2):102-108.
32. D'Ambra-Cabry K, Deng DH et al. *Antigen retrieval in immunofluorescent testing of bullous pemphigoid*. Am J Dermatopathol. 1995; 17:560–563.
33. Al-Rifai I, Kanitakis J et al. *Immunofluorescence diagnosis of bullous dermatoses on formalin-fixed tissue sections after antigen retrieval*. Am J Dermatopathol. 1997;19:103–105.
34. Buch AC, Kumar H et al. *A cross-sectional study of direct immunofluorescence in the diagnosis of immunobullous dermatoses*. Indian journal of dermatology. 2014; 59(4), 364.
35. Magro CM, Pope Harman A et al. *Use of C4d as a diagnostic adjunct in lung allograft biopsies*. Am J Transplant. 2003; 3:1143-54.
36. Magro CM, Abbas AE et al. *C3d and the septal microvasculature as a predictor of chronic lung allograft dysfunction*. Hum Immunol. 2006; 67: 274-83.
37. Ranjan P, Nada R et al. *The role of C4d immunostaining in the evaluation of the causes of renal allograft dysfunction*. Nephrol Dial Transplant. 2008; 23:1735-41.
38. Mroz A, Lewandowski Z et al. *C4d complement split product in diagnosis of immunological activity of chronic allograft nephropathy*. Transplant Proc. 2006; 38:97-100.
39. Baldwin WM, Samaniego-Picota M et al. *Complement deposition in early cardiac transplant biopsies is associated with ischemic injury and subsequent rejection episodes*. Transplantation. 1999; 68: 894-900.
40. Magro CM, Dyrsen ME et al. *The use of C3d and C4d immunohistochemistry on formalin-fixed tissue as a diagnostic adjunct in the assessment of inflammatory skin disease*. J Am Acad Dermatol. 2008;59:822–833.
41. Chandler W, Zone J et al. *C4d immunohistochemical stain is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in bullous pemphigoid*. J Cutan Pathol. 2009; 36:655-659.
42. Glauser S, Rutz M et al. *Diagnostic value of immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded skin biopsy specimens for bullous pemphigoid*. Br J Dermatol 2016;175:988–993.
43. Pfalz K, Mertz K et al. *C3d immunohistochemistry on formalin-fixed tissue is a valuable tool in the diagnosis of bullous pemphigoid of the skin*. J Cutan Pathol. 2010; 37:654-658.
44. Kayani M, Aslam AM et al. *Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris*. BMJ. 2017;357:j2169.

45. Sitaru C, Zillikens D *et al.* *Mechanisms of blister induction by autoantibodies.* *Exp Dermatol* 2005;357:861-75.
46. Kotnik V. *Complement in skin diseases.* *Acta Dermatovenerol.* 20 (2011) 3–11.
47. Kara M, Demir F *et al.* *The Impact of C4d Staining as a Humoral Injury Marker.* *Transplant Proc* 2012; 44:1694-6.
48. Villani AP, Chouvet B *et al.* *Application of C4d immunohistochemistry on routinely processed tissue sections for the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses.* *Am J Dermatopathol.* 2016; 38:186-8.
49. Ghanadan A, Saghadzadeh A *et al.* *Direct immunofluorescence for immunobullous and other skin diseases.* *Expert Rev Clin Immunol* 2015;11(5):589–96.
50. Suliman NM, Astrom AN *et al.* *Clinical and histological characterization of oral pemphigus lesions in patients with skin diseases: a cross sectional study from Sudan.* *BMC Oral Health* 2013;13:66–70.
51. Alshenawy HA. *Can immunohistochemistry replace immunofluorescence in diagnosis of skin bullous diseases?.* *APMIS* 2017; 125: 114–121.
52. Della Torre R, Combescure B *et al.* *Clinical presentation and diagnostic delay in bullous pemphigoid: a prospective nationwide cohort.* *Br J Dermatol.* 2012; 167:1111-1117.
53. Joly P, Baricault S, Sparsa A *et al.* *Incidence and mortality in bullous pemphigoid in France.* *J Invest. Dermatol.* 2012; 132: 1998-2004.
54. Bird P, Friedmann PS *et al.* *Subclass distribution of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid.* *J Invest Dermatol* 1986; 86: 21.
55. Shirakata Y, Shiraishi S *et al.* *Subclass characteristics of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid and pemphigus.* *J Dermatol* 1990; 17: 661.
56. Buschman KE, Seraly M *et al.* *A predominant IgG4 subclass may be responsible for false-negative direct immunofluorescence in bullous pemphigoid.* *J Cutan Pathol* 2002; 29: 282.
57. Zhang X, Hyjek E *et al.* *Immunohistochemistry for immunoglobulin G4 on paraffin sections for the diagnosis of pemphigus.* *Arch Pathol Lab.* 2012; 136:1402-1407.

Center	Age	Sex	Clinical presentation	Sample location
CHUGA	66	M	History of PV Recurrence of erythematobullous lesions of the nose with erosions	Nose biopsy (2018)
			No clinical data	Left temple biopsy (2004)
CHUGA	43	F	2-month oral ulcers resistant to corticosteroid therapy, suppurative alopecic lesion of the vertex and pruritic nodules of the back	Back biopsy
CHUGA	57	F	History of pelade (phototherapy for 6 months) Exulcerated crouteous lesions of the scalp for 1 month with progressive extension to the neckline and trunk with flaccid blisters. Nikolsky positive in healthy and perilesional skin No mucosal damage	Right scapular biopsy
CHUGA	62	M	History of superficial PV Erosive lesions of the penis and preputial balano sulcus	Balano preputial sulcus biopsy
CHUGA	84	F	3 months of diffuse pruritus and extensive erosions of the thorax, abdomen, back and upper limbs with precessive bullous lesions	Right elbow fold biopsy
CHUGA	53	M	Aphthas, crouteous nose lesions, scalp damage, bullous back lesions	Back biopsy
CHUGA	41	F	For several months nummular itchy erythematous-squamous lesions of the face, neckline, back and upper limbs with vesicles around some lesions positive Nikolsky sign	Neckline biopsy
Timone	74	F	No clinical data	Right thigh biopsy
Timone	34	M	Extensive flaccid bullous dermatitis	Unspecified
Timone	61	F	Erosions of the scalp and shoulders	Right shoulder biopsy
Timone	19	M	No clinical data	Unspecified
Timone	58	F	Recurrence of PV	Back biopsy
Timone	46	F	Abdominal blisters	Abdominal biopsy
Timone	46	F	No clinical data	Unspecified
Timone	91	F	Bullous lesions of trunk	Trunk biopsy
Timone	72	F	No clinical data	Unspecified

**Table 1 : Clinicopathological characteristics of the patients with pemphigus vulgaris (PV).**

Center	Age	Sex	Clinical presentation	Sample location
Timone	90	M	Tensed blisters of the feet and hands since one week after a pruritic erythematous closets period	Right foot biopsy
Timone	82	F	No clinical data	Back biopsy
Timone	91	F	No clinical data	Left thigh biopsy
Timone	84	F	Bullous lesions of limbs and diffuse pruritus with scratching lesions	Biopsy of the lateral and external face of the left leg
Timone	78	F	More than 150 blisters and pruritus since one month	Left flank biopsy
Timone	84	M	No clinical data	Left thigh root biopsy
Timone	72	F	Left axillary blister	Left axillary biopsy
Timone	58	F	Bullous rash of limbs on urticarial placard with skin separation	Right forearm biopsy
Timone	76	F	Blisters on urticarial placard of the left thigh	Left thigh biopsy
Timone	77	M	No clinical data	Right elbow biopsy
Timone	83	F	No clinical data	Unspecified
Timone	72	M	Erosive trunk and limb lesions with pruritus	Unspecified
Timone	73	M	Bullous lesions of the limbs	Left thigh biopsy
Timone	87	M	Tensed blisters of the limbs, damage to the buccal mucosa	Right arm biopsy
Timone	78	M	Generalized bullous rash on urticarial placards for two months, negative Nikolsky sign	Back biopsy
Timone	57	M	No clinical data	Left forearm biopsy
Timone	86	M	Bullous lesions of the lower limbs and pruritus	Right thigh biopsy
Timone	81	F	No clinical data	Unspecified
Timone	88	M	No clinical data	Right thigh biopsy
Timone	76	M	No clinical data	Left back biopsy
Timone	64	M	Urticariiform plates and upper extremity blisters	Right arm biopsy
Timone	84	M	No clinical data	Left thigh biopsy
Timone	61	F	No clinical data	Right thigh biopsy
Timone	72	F	No clinical data	Unspecified
Timone	81	M	No clinical data	Right foot biopsy
Timone	89	F	Bullae for several weeks	Unspecified
CHUGA	88	M	Bullous rash of limbs on eczematiforms placards and diffuse pruritus	Abdominal biopsy
CHUGA	86	M	Bullous lesions, post bullous erosions and urticarial placards of the limbs, buccal involvement, pruritus	Left shoulder biopsy
CHUGA	81	F	diffuse tensed bullous lesions predominantly on the limbs for several months, pruritus No endobuccal lesion	Biopsy of the internal face of the right forearm
CHUGA	86	M	Chest tensed blisters with clear substance for 6 months	Right anterior thoracic wall biopsy
CHUGA	82	F	Erythematopapular plaques on trunk and limbs with tense clear blisters.	Left wrist biopsy
CHUGA	73	F	Itchy erythematous rash of the arms, thighs and trunk with bullous lesion of the thigh root right	Right thigh biopsy
CHUGA	85	M	Tense blisters and diffuse post-bullous erosions predominantly in the abdominal region	Left chest biopsy
CHUGA	92	F	pruritic Bullous lesions on urticarial background for one month	Biopsy of the internal face of the left thigh
CHUGA	92	M	Diffuse pruritus for several weeks and tense bullae of the limbs	Right knee biopsy
CHUGA	89	F	Bullous lesion of the wrist	Wrist biopsy
CHUGA	64	M	Psoriasis, recent bullous formation on a psoriasis plaque on the left calf Pruritic lesion on erythematous background	Left calf biopsy
CHUGA	76	F	Tensed blisters of the limbs, buccal involvement	Biopsy of the internal face of the right foot
CHUGA	69	M	Mouth ulcers for 2 months Appearance of a tensed blister of 0.5cm on an erythematous background of the right forearm	Right forearm biopsy
CHUGA	74	M	Vesiculo-bullous lesions on erythematous palmoplantal placards, chronic pruritus context	Biopsy of the dorsal face of the left wrist
CHUGA	87	F	No clinical data	Unspecified
CHUGA	92	F	Tensed limb blisters with serous or haemorrhagic content, severe pruritus	Left arm biopsy

**Table 2 : Clinicopathological characteristics of the patients with bullous pemphigoid.**

Center	Age	Sex	Clinical presentation	Diagnosis	Sample location
CHUGA	87	F	Profuse pruritus with prurigo papules	Grover's disease	Lumbar biopsy
CHUGA	60	F	non-itchy Punctiform rash, resistant to dexeryl treatment	Grover's disease	Unspecified
CHUGA	75	M	Bullous lesions of the lower limbs	Stasis blister Arterioveinous insufficiency	Biopsy of the anterior face of right thigh
CHUGA	63	F	pruritic tensed vesiculo-blisters on the forearm	Inflammatory blister	Forearm biopsy
CHUGA	85	F	Skin separation on ecchymotic purpura	Mechanical blister	Abdominal biopsy
CHUGA	45	M	Context of inflammatory rheumatism without etiology found with methotrexate treatment Macules on trunk and limbs	Healthy skin	Right forearm biopsy
CHUGA	25	M	Scar recovery of the sacrum	Healthy skin	Sacral biopsy
CHUGA	59	M	erythematous Squamous rash of the trunk and upper limbs for one month, absence of atopic context	Healthy skin	Unspecified
CHUGA	32	F	Thickening of the left breast skin in the context of breast tumour	Healthy skin	Left breast biopsy
CHUGA	48	F	Nodular maculopapular erythematous lesions, sepsis Suspicion of secondary localization in a context of acute lymphoblastic leukemia with chemotherapy	Healthy skin	Unspecified
CHUGA	21	M	Post tick bite granuloma	Healthy skin	Biopsy of the internal face of the right elbow
CHUGA	2	M	Sudden infant death	Healthy skin	Unspecified
CHUGA	63	M	Unexplained coma with negative explorations, search for a deposit disease	Healthy skin	Left thigh biopsy
CHUGA	72	F	General impairment with history of breast cancer, trunk nodules	Healthy skin	Trunk biopsy
Timone	67	M	Bullous lesions of the limbs	Mechanical blister	Unspecified

**Table 3 : Clinical characteristics of control cases.**

	PV n=16	BP n= 42	Control cases n=15	p value
Sex (F/M)	11/5	20/22	7/8	0,329
Median age, y (range)	57,5 (19-91)	81,5 (57-92)	60 (2-87)	<b>&lt;0,001</b>
p 25 age	45,25	73,25	38,5	
p 75 age	67,5	86,75	69,5	

**Table 4 : Comparison of the main characteristics (sex and age) of the patients with pemphigus vulgaris (PV) with those of the patients with bullous pemphigoid (BP) and control cases.**

	BP (n : 42)	PV (n : 17)	Controls (n : 15)
C3d +	n : 30 (71%)	n : 8 (47%)	n : 0
C4d +	n : 34 (81%)	n : 9 (53%)	n : 0

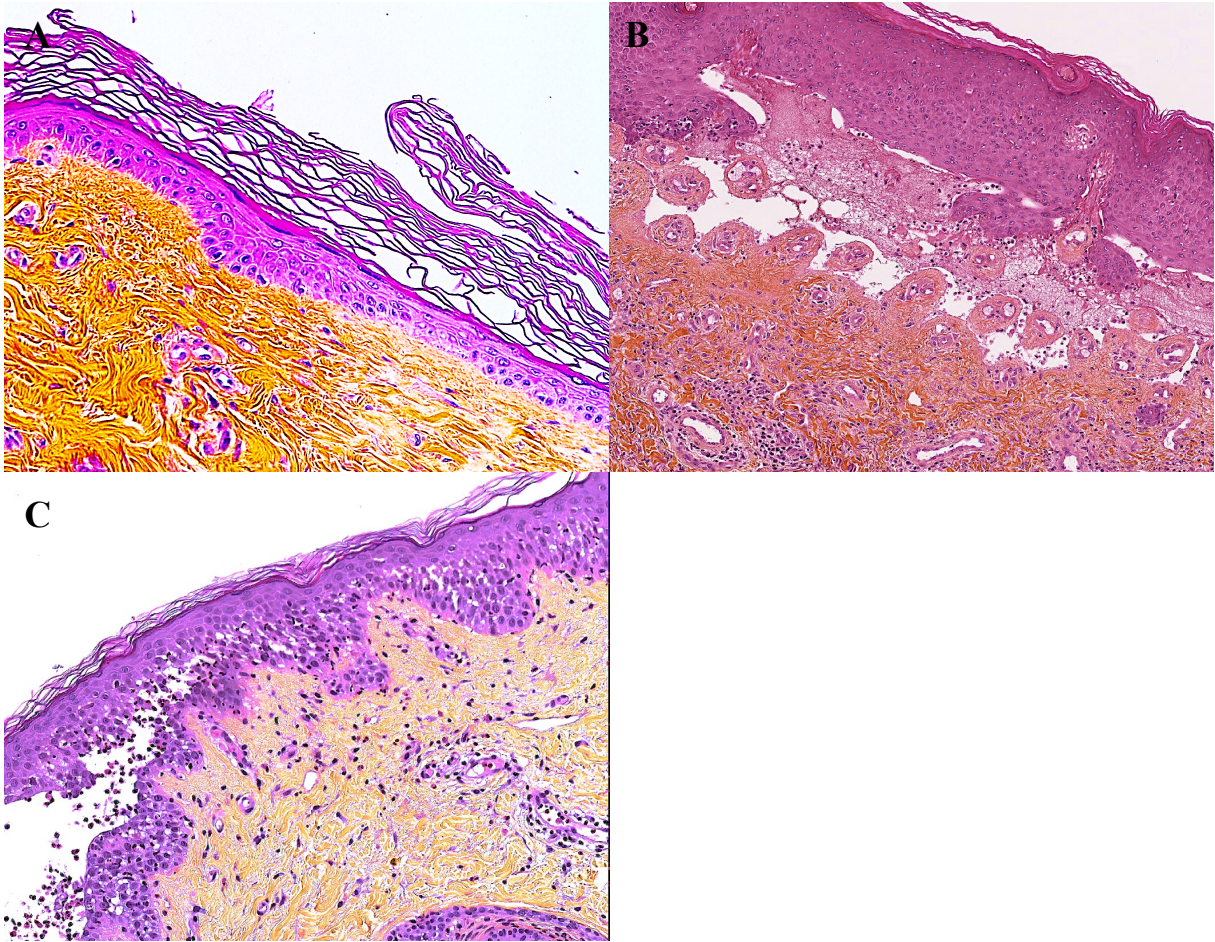
**Table 5 : C3d and C4d immunohistochemistry of bullous pemphigoid (BP), pemphigus vulgaris (PV) and controls.**

C3d and/or C4d negative	IIF +	IIF-	Serological status unavailable
BP (n :14)	n : 5 (36%)	n : 3 (21%)	n : 6 (43%)
PV (n :10)	n : 4 (40%)	n : 2 (20%)	n : 4 (40%)

**Table 6 : Serological status of bullous pemphigoid (BP) and pemphigus vulgaris (PV) for C3d and/or C4d negative cases when available. (IIF: indirect immunofluorescence).**

IHC	Case	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
C3d	BP	71% (IC95 54,8%-83,4%)	100% (IC95 89,6%-99,8%)	100% (IC95 89,6%-99,8%)	55,5% (IC95 39,5%-70,5%)
	PV	47% (IC95 23,8%-71,4%)	100% (IC95 77,1%-99,5%)	100% (IC95 77,1%-99,5%)	62,5% IC95 (36,7%-83,2%)
C4d	BP	81% (IC95 65,4%-90,9%)	100% (IC95 89,6%-99,8%)	100% (IC95 89,6%-99,8%)	65% (IC95 48,7%-78,6%)
	PV	53% (IC95 28,6%-76,2%)	100% (IC95 77,1%-99,5%)	100% (IC95 77,1%-99,5%)	65% (IC95 38,9%-84,9%)

**Table 7 : Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) of the studied markers in bullous pemphigoid (BP) and pemphigus vulgaris (PV). (IC : confidence interval).**



**Figure 1: Hematoxylin eosin saffron (HES): healthy skin biopsy used as control (A), subepidermal and intra-epidermal blistering in bullous pemphigoid (B) and pemphigus vulgaris (C) with presence of inflammatory infiltrate.**



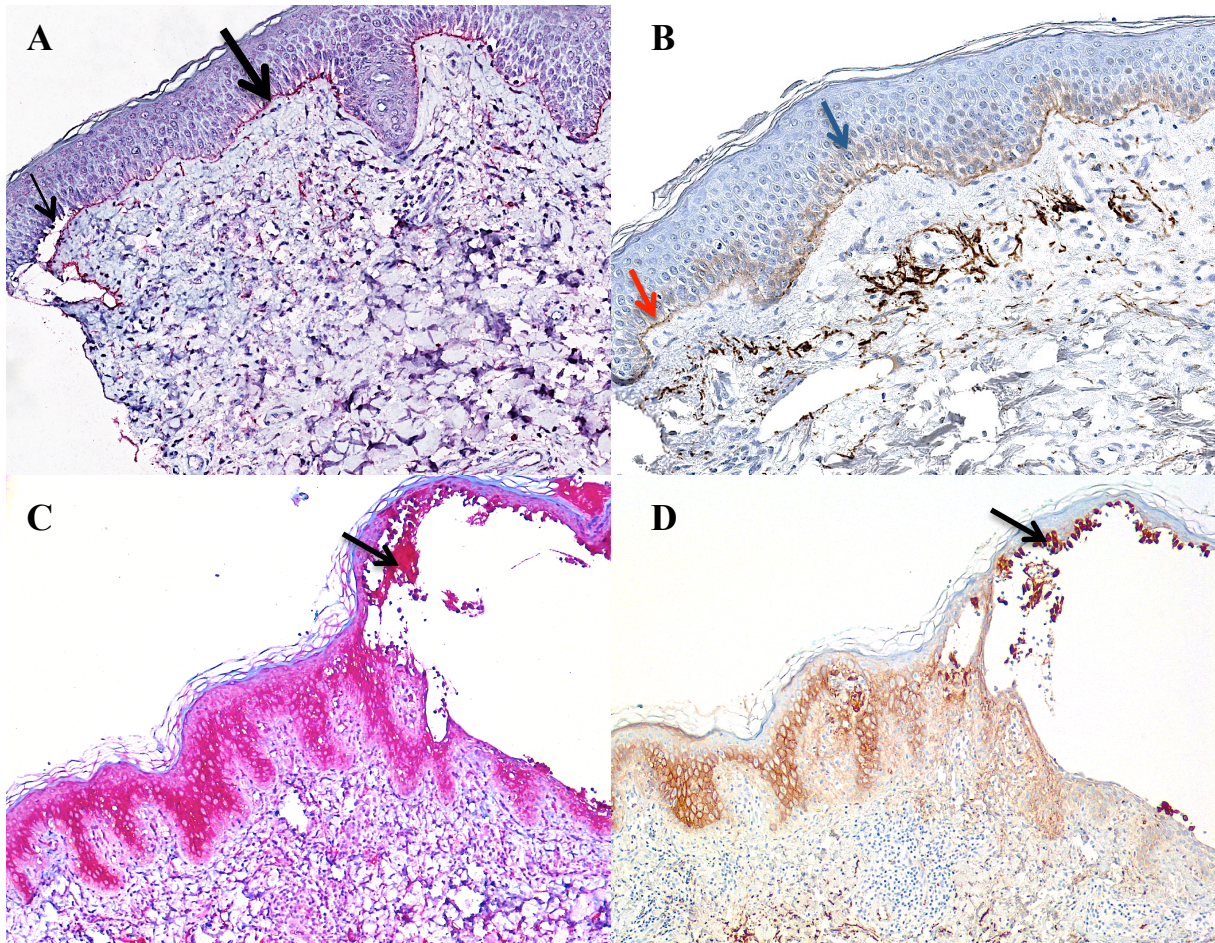
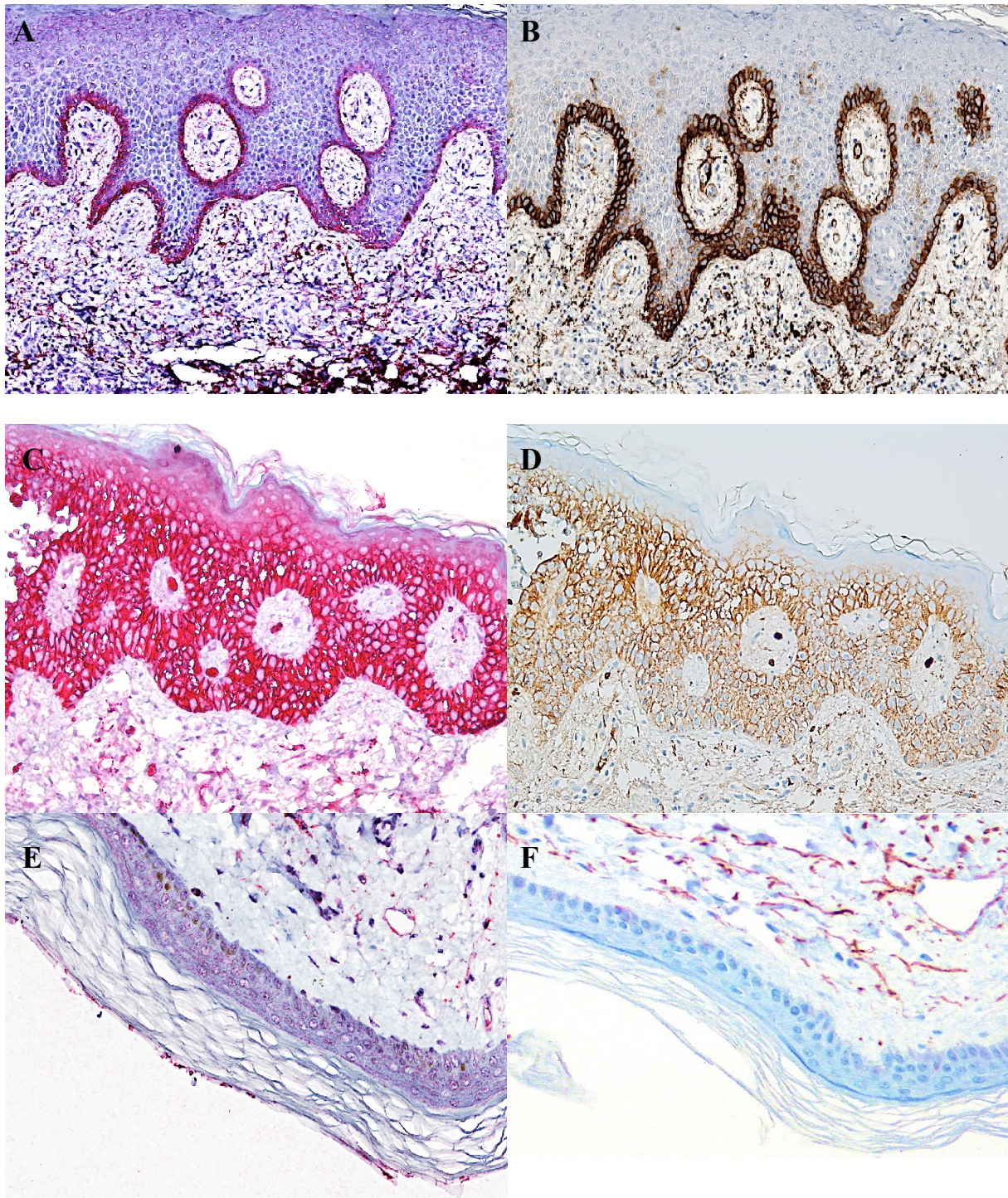


Figure 2 : C3d (A) and C4d (B) immunostaining in bullous pemphigoid : linear deposition along the dermo-epidermal junction (A :bold arrow, B : red arrow) associated with deposits on the surface of basal epidermal keratinocytes (B) (blue arrow). C3d labeling (A) is present both on splitted area (arrow) and on noncleaved skin (bold arrow). C3d (C) and C4d (D) immunostaining in pemphigus vulgaris: « intercellular » deposition associated with deposits on the surface of acantholytic cells in the intraepidermal blister (arrow).



**Figure 3: Linear C3d (A) and C4d staining (B) at the dermo-epidermal junction on formalin-fixed-paraffin-embedded tissue from a case of bullous pemphigoid, « intercellular » C3d (C) and C4d (D) staining from a case of pemphigus vulgaris and negative immunoreactivity in healthy skin biopsy used as a control case (E: C3d, F: C4d).**