UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : ***ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE***

Spécialité IMMUNOLOGIE :

Présentée et soutenue publiquement par

Meriem RIANI

Le 2 février 2017

Rôle de la chimiokine CXCL10 dans la réaction inflammatoire associée à l'autoimmunité : exemple de la pemphigoïde bulleuse

---

Thèse dirigée par Pr. Frank ANTONICELLI

JURY

M. Philippe BERNARD**,**	Professeur	URCA,	**Président**
M. Frank ANTONICELLI**,**	Professeur,	URCA,	**Directeur de thèse**
Mme Delphine STAUMONT SALLE,	Professeur,	Université de Lille,	**Rapporteur**
M. Nicolas FAZILLEAU,	Directeur de Recherche,	INSERM, Toulouse,	**Rapporteur**



Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas

Léonard De Vinci

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser ma profonde reconnaissance à l'ensemble de mon Jury de thèse…

A Monsieur le Professeur Philippe Bernard, qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de soutenance. Merci également pour vos conseils et critiques qui ont toujours été constructifs durant ma thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur Delphine Staumont Salle et Monsieur le Docteur Nicolas Fazilleau, je vous remercie chaleureusement de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse malgré vos obligations professionnelles, la distance et vos emplois du temps chargés.

Et tout particulièrement au

Professeur Frank Antonicelli, pour avoir dirigé cette thèse. Je lui suis reconnaissante pour la confiance qu'il m'a accordée et l'expérience dont il m'a fait bénéficier. Je le remercie particulièrement pour les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons partagées, pour sa franchise à toute épreuve et de m'avoir toujours poussée (parfois à bout☺) pour tirer le meilleur de mes compétences. Ce projet de thèse n'était pas de toute évidence dès le départ et c'était une vraie aventure confrontant plusieurs obstacles administratives, je le remercie particulièrement pour son soutien et son encouragement à toute épreuve malgré les périodes de doutes.

Je vous remercie Frank pour tout ! Je suis heureuse que nous arrivions à réussir notre challenge. Je vous souhaite toute la réussite ainsi qu'à notre jeune équipe Dem-IC que j'ai vu naitre et que je serais ravie d'avoir toujours de ses nouvelles.

Je remercie également mes collègues de laboratoire

Docteur Sébastien lejan, mon collègue de bureau. Merci absolument pour tout Seb, ton aide, ta générosité, ta gentillesse et ta disponibilité. J'ai toujours pu compter sur toi dans des soucis de manips et surtout dans les problèmes informatiques. Merci pour ces petits moments de bonheur au labo, pour ces discussions scientifiques et pas que ! Une page entière de remerciements ne suffirait pas à retranscrire toute ma reconnaissance. C'est donc avec une sincère amitié que je te remercie pour tout le soutien que tu m'as apporté. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites amplement, et j'aurais toujours une petite pensée à toi chaque 24 janvier☺.

Docteur Aurélie Trussardi Régnier, pour son aide précieuse, ses conseils avisés, sa gentillesse et sa disponibilité. Aurélie, Merci particulièrement pour votre encouragement et votre bonne humeur contagieuse dans les moments difficiles. Il est bien rare pour moi de croiser des personnes si attachantes et si douces dans ce monde qu'est la recherche. C'est un honneur pour moi d'avoir croisé votre chemin. Je vous souhaite toute la réussite dans vos projets futurs.

La grande rencontre de cette thèse, ma chère Marwa hentati kallel. J'estime déjà que c'est très rare de croiser de véritables amis dans la vie, mais de les croiser sur le chemin du travail et dans une ville où je venais tout juste de débarquer, ca relevais pour moi d'un coup de chance inespéré. Merci Marwa de traverser avec moi ces années de travail dans les bonnes et surtout les mauvaises périodes. Merci, pour être toujours présente quand j'avais besoin même à distance. Ça a été un régal de partager avec toi les manips, les pauses café et les déjeuner, les longs weekends de travail au labo, nos interminables discussions et l'écriture de nos thèses. Merci pour tous ces moments de bonheur qui resteront à jamais gravé dans ma mémoire. Sans toi, cette thèse aurait été bien certainement plus dure. Je te souhaite toute la réussite et le meilleur pour la suite et que ces années marque le début d'une grande amitié que j'espère pour toujours.

Je souhaite également remercier….

…ceux qui ont partagé un « bon » bout de mon chemin de thèse,

Aux anciens du labo julie, julia, alex, anais et à ceux que j'ai connu récemment bertille, et justine, aux souvenirs des bons moments passés au labo.

A Camille, que je n'ai malheureusement pas pu assez connaitre mais je la remercie pour sa disponibilité et pour tout le travail qu'elle a fait pour moi.

A Clara, aux souvenirs des bons moments partagés à la fin de cette thèse et surtout pour le chocolat !

A Céline, je t'ai connu malheureusement à la fin de cette thèse. Grâce à ta gentillesse et à ta bonne humeur, les trois derniers mois que j'ai passés au labo étaient un vrai moment de plaisir pour moi. Merci pour ton aide et ta disponibilité. Je te souhaite toute la réussite pour le futur.

Merci à vous tous pour les années partagées au labo, elles ne s'effacent pas. J'ai entamé mon parcours avec certaines personnes et clôturer cette étape avec d'autres. Chaque personne a joué un rôle spécial pour moi. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau pour de nouvelles aventures !

Je tiens aussi à remercier le personnel et mes anciens collègues de la SFR,

A Corinne, Aurélie, Jennifer, Céline, Julien, Joan, karim et Fatma. Merci pour votre aide, votre bonne humeur et tous ces instants qui resteront inoubliables !

Je remercie également les responsables de l'école doctorale,

Madame Nathalie Le barch, la responsable administrative de l'ED, merci madame pour votre écoute et votre disponibilité. Vous avez toujours su résoudre mes problèmes administratifs avec un sourire et des mots encourageants. Veuillez trouver ici l'expression de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

Madame Estelle Odinot, la secrétaire de l'ED, je vous remercie madame pour votre disponibilité et votre gentillesse.

C'est également avec émotion que je souhaite remercier tous les miens…

Qui ont implanté en moi cette force qui surgit d'un bonheur cultivé. Il est finalement plus facile d'écrire sur les macrophages et sur les cytokines que de témoigner en quelques lignes de toute l'attention, l'affection et l'amour pour mes proches.

Je remercie toute ma famille ainsi que ma belle famille et mes amis pour leur présence, leur confiance, et leur encouragement sans faille.

… et tout particulièrement,

Mes chers parents, à qui je dédie spécialement cette thèse. Tout le chemin parcouru n'aurait pas été possible sans vous. Vous m'avez fait confiance dans mes choix, et bien que le cœur gros, vous m'avez laissé partir tenter ma chance. Vous m'avez inculqué des valeurs humaines qui ont fait ma force durant cette thèse. Je vous remercie pour tout cela. La fierté que je peux lire dans vos yeux récompense aujourd'hui tous mes efforts. Je vous aime énormément !

Mes frères Walid, Hassen et Souha ainsi que mon adorable petit neveu Midou. Merci pour votre soutien et d'avoir toujours cru en moi.

Mon cher mari Mourad, je ne saurais trouver les mots pour te remercier, t'a toujours cru en moi et t'a su m'encourager durant les moments difficiles. Merci surtout de me supporter en cette période de fin de thèse et d'avoir facilité ma vie au quotidien pour me permettre d'avoir plus de temps pour travailler. Merci aussi d'avoir su comprendre mes nombreuses crises de stress et de sauts d'humeur.

Merci …….de partager ma vie tout simplement, et vivement le nouveau chapitre d'avenir qui nous attend !

Tendrement,

Meriem

RESUME :

La pemphigoïde bulleuse (PB) est la plus fréquente et la plus grave des dermatoses bulleuses auto-immunes caractérisée par une cascade inflammatoire impliquant plusieurs cytokines et cellules inflammatoires, avec la libération de protéases (MMP-9, élastase) conduisant à la formation de la bulle. L'objectif de cette étude est de caractériser cette cascade inflammatoire en analysant la contribution de la chimiokine CXCL10 et des cellules inflammatoires comme les macrophages dans le mécanisme physiopathologique associé à la maladie. Nos résultats ont montré que CXCL10 est présent à des taux importants dans le sérum des patients et dans le liquide de bulle, de plus cette chimiokine reste fortement présente dans le sérum des patients qui rechutent. D'autre part nous avons montré pour la première fois que l'orientation des macrophages dans la PB est contrôlée dans un premier temps par les sérums de patients, qui préactivent les macrophages, puis par le liquide de bulle qui les différencient vers une polarisation M2. Nous avons également montré que seulement les neutrophiles et les monocytes isolés de patients atteints de PB, mais pas leur lymphocytes, répondaient à une stimulation par CXCL10 par une augmentation de leur sécrétion en MMP-9 via l'activation des voies de signalisation ERK1/2, P38 et PI3K. Cette expression de la MMP-9 a été associée à une polarisation de type M2 dans les macrophages issus de monocytes de patients. Enfin, nous avons montré l'importance des activateurs sélectifs des récepteurs des glucocorticoïdes, tels que le composé A, qui était aussi efficace que le traitement avec la méthylprednisolone dans l'inhibition de la MMP-9, mais avec des effets distincts sur l'expression des marqueurs phénotypiques de macrophages.

Mots clés : pemphigoïde bulleuse, autoimmunité, inflammation, CXCL10, MMP-9, polarisation des macrophages, composé A.

Titre en anglais: Role of the chemokine CXCL10 in the inflammatory response associated with autoimmunity: example of bullous pemphigoid

ABSTRACT:

Bullous pemphigoid (BP) is the most common and serious autoimmune bullous dermatosis characterized by inflammatory cascade involving many cytokines and inflammatory cells, with the release of proteases (MMP-9, HLE) leading to the formation of the blister. The objective of this study is to characterize the inflammatory cascade by analyzing the contribution of the CXCL10 chemokine and inflammatory cells such as macrophages in the pathophysiology associated with the disease. Our results showed that CXCL10 is present at significant levels in the serum of patients and in the blister fluid, this chemokine remains strongly present in the serum of patients who relapse. On the other hand we have shown for the first time that macrophages polarization in BP is controlled by the sera of patients, which activate macrophages, and then blister fluid differentiate macrophages in an M2 polarization. We also showed that only neutrophils and monocytes isolated from patients, but not the lymphocytes

responding to stimulation by CXCL10 by an increase in secretion of MMP-9 via the activation of signaling pathways ERK1 / 2, P38 and PI3K. This expression of MMP-9 has been associated with an M2 macrophages polarization derived from monocytes of patients. Finally, we have demonstrated the importance of selective glucocorticoid receptor activators, such as Compound A, which was as effective as treatment with methylprednisolone in inhibiting MMP-9, but with distinct effects on the expression of phenotypic markers of macrophages.

Key words: Bullous pemphigoid, autoimmunity, inflammation, CXCL10, MMP-9, macrophage polarization, Compound A

INTITULE ET ADRESSE DE L'UNITE DE RECHERCHE :

Laboratoire de dermatologie, EA-7319 Derm-I-C, Faculté de Médecine, 51 rue Cognaq Jay, 51100 REIMS.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 1
RESUME 4
LISTE DES FIGURES 8
ABREVIATIONS 9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 10
Chapitre 1 . La pemphigoïde bulleuse 11
I . Epidémiologie 11
II . Diagnostic 11
III . Physiopathologie 13
III.1 Architecture et organisation de la JDE 13
III.2 Antigène BP230 et Antigène BP180 15
III.3 Rôle physiopathologique des auto-anticorps dans la pemphigoïde bulleuse 16
IV . Traitement 17
IV.1 Corticothérapie générale et locale 17
IV.2 Traitements immunosuppresseurs 17
Chapitre 2 : La réponse inflammatoire dans la pemphigoïde bulleuse 18
I . Généralités 18
II . Mécanismes de l'inflammation dans la pemphigoïde bulleuse 20
III . Les cellules de l'inflammation 21
III.1 Les mastocytes 21
III.2 Les neutrophiles 21
III.3 Les macrophages 22
III.4 Les lymphocytes 23
III.5 Les kératinocytes 24
IV . Les médiateurs de l'inflammation 25
IV.1 Les Cytokines 25
IV.2 Les protéases 25
Chapitre 3: La chimiokine CXCL10 26
I . Caractérisation 26
II . Cellules productrices de CXCL10 28
III .Les récepteurs de CXCL10 29
III.1 Caractérisation 29
III.2 Signalisation 32
IV . Principales pathologies impliquant CXCL10 et ses récepteurs 33

IV.1 Inflammation et maladies autoimmunes 33
Chapitre 4 : La métalloprotéinase matricielle 9 34
I . Caractérisation 34
II . Expression 36
III . Régulation 36
III.1 Régulation transcriptionnelle 37
III.2 Activation 37
III.3 Inhibition 38
IV . Rôle de la MMP-9 dans certaines pathologies 39
IV.1 Inflammation 39
IV.2 La pemphigoïde bulleuse 39
Chapitre 5. Macrophages et polarisation 40
I . Origine 40
II . Propriétés fonctionnelles 42
III . Polarisation 43
III.1 La polarisation pro-inflammatoire de type M1 43
III.2 La polarisation anti-inflammatoire de type M2 44
III.2.1 M2a 44
III.2.2 M2b 45
III.2.3 M2c 45
IV . Rôle de la polarisation des macrophages dans certaines pathologies 46
IV.1 Inflammation 46
IV.2 La pemphigoïde bulleuse 47
OBJECTIF DU TRAVAIL 49
RESULTATS 52
A. Rôle de la chimiokine CXCL10 dans la réponse inflammatoire associée à la PB 53
1. Synthèse 53
2. Publication n°1 55
B. Rôle de la polarisation des macrophages dans la physiopathologie de la PB 69
1.Synthèse 69
2.Publication n°2 71
DISCUSSION GENERALE 98
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 106

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Pemphigoïde bulleuse: bulles tendues sur peau érythémateuse.....12
Figure 2. Bulle sous-épidermique avec clivage dermo-épidermique 12
Figure 3. Dépôts d'anticorps le long de la jonction dermo-épidermique 13
Figure 4. Modèle schématique de la membrane basale épidermique. 14
Figure 5. Structure du BP230 humain.....15
Figure 6. Structure du BP180 humain.....16
Figure 7. *Le mécanisme de formation de la bulle dans le modèle murin de PB* 22
Figure 8. Structure tridimensionelle de CXCL10 28
Figure 9. La boucle d'auto-amplification de l'expression de CXCL10 29
Figure 10. Structure du récepteur CXCR3 30
Figure 11. Représentation schématique des 3 isoformes de CXCR3.....31
Figure 12. Représentation schématique des voies de signalisation du récepteur CXCR3 ...32
Figure 13. Amplification de la réaction inflammatoire dans la PR via l'axe CXCR3 34
Figure 14. Structure des métalloprotéases 36
Figure 15. Représentation schématique de la synthése et de l'activation de la MMP-9 38
Figure 16. Mécanisme d'activation de la MMP-9 dans la PB.....40
Figure 17. Origine et hétérogénéité des macrophages 42
Figure 18. Caractérisation des différentes populations de macrophages 46

ABREVIATIONS

A
AKT : protéine Kinase B
AMP : adénosine monophosphate
AP-1 : activator protein-1
ARNm : acide ribonucléique messager

B
BPDAI : Bullous Pemphigoid Disease Area Index

C
CD : Cluster of Differentiation
CMH : molécule du complexe majeur d'histocompatibilité
CLR: C lectin receptors

D
DAMP: damaged associated molecular patern

E
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
ERK: extracellular-related kinase

G
GMP : Guanosine monophosphate,
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor / facteur de stimulation de colonies de granulocytes
GM-CSF : granulocyte-mmonocyte colony-stimulating factor /

H
HS: Heat shock

I
IFN: interféron
Ig : immunoglobuline
IHC : immunohistochimie
IL : interleukine

J
JDE: Jonction dermique épidermique
JNK: c-Jun N-terminal kinases

L
LB: liquide de bulle

M
MAPK: mitogen-activated protein kinases
MMP : métalloprotéinase
MMR: Macrophage mannose receptor
MP : méthylprednisolone

N
NF-κB: nuclear factor-kappa B
NK: natural killer
NLR: NOD like receptor

P
PAMP: Pathogen associated molecular patern
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PMN: Polymorphonuclear leukocyte
PRR: pattern recognition receptor

R
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
RLR: RIG-1 like receptors

T
TAM: tumor-associated macrophage
TGF: transforming growth factor
Th: T helper / T auxiliaire
TLR: toll-like receptor / récepteur toll-like
TNF : tumor necrosis factor / facteur de nécrose tumorale
TIMP : inhibiteur tissulaire des MMP

U
uPA : urokinase plasminogen activator / activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR : récepteur d'uPA

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 . La pemphigoïde bulleuse

La pemphigoïde bulleuse (PB) est la plus fréquente des dermatoses bulleuses autoimmunes. Elle fait partie du groupe des maladies bulleuses sous-épidermiques au même titre que la pemphigoïde cicatricielle, l'épidermolyse bulleuse acquise, la dermatose à IgA linéaire, la pemphigoïde gravidis et la dermatite herpétiforme. Elle se définit sur le plan immunologique par une production d'auto-anticorps dirigés contre deux macromolécules de structure de l'hémidesmosome de masses moléculaires de 230 kDa (BP230) et de 180 kDa (BP180).

I. Epidémiologie

La PB est non seulement la plus fréquente, mais aussi la plus grave des dermatoses bulleuses autoimmunes sous-épidermiques. Son incidence est variable en fonction des pays, allant de 2,6 à 42,8/10^6 habitants/an [1] [2]. Plusieurs études ont rapporté une augmentation d'incidence de cette pathologie. En France le taux d'incidence a triplé en 10 ans, passant de 7/10^6 habitants/an à 21.7/10^6 habitants/an [3] [4].

Les facteurs de risque liés à cette maladie sont variables, néanmoins l'âge élevé reste le principal facteur de risque. Cette maladie se développe souvent chez les sujets âgés de plus de 70 ans et le risque est 300 fois plus important pour les sujets de plus de 90 ans que pour les sujets de 60 ans et moins [5]. Au vu de l'âge des malades, le taux de mortalité dans la première année des patients atteints de PB est de l'ordre de 12 à 19 %, ce taux est 3 fois supérieur au taux observé dans la population générale du même âge [3] [4].

En plus, des pathologies neurologiques comme les démences, la maladie de Parkinson, les accidents vasculaires ou les troubles uni ou bipolaires augmentent le risque de développer une PB , bien que les liens entre ces pathologies reste mal connu [6].

D'autre part, certaines études ont établi un lien entre la prise de certains médicaments de la famille des antagonistes de l'aldostérone (Spironolactone) ou de phénothiazines à chaînes aliphatiques et la survenue de cette maladie [7].

II. Diagnostic

Le diagnostic de la PB repose sur plusieurs critères définis par les critères de Vaillant [8]. De point de vue clinique, une étude prospective multicentrique a permis de valider 4 critères

diagnostiques de la PB : âge supérieur à 70 ans, absence d'atteinte préférentielle de la tête et du cou, absence d'atteinte muqueuse, et absence de cicatrices atrophiques [8] [9] . Cette maladie, débute généralement par des bulles tendues de grandes tailles à contenu séreux, prédominant à la racine et à la face interne des membres, respectant généralement le visage et les muqueuses externes, et guérissant sans cicatrice atrophique *(figure1)*[10] . Récemment, un score BPDAI (Bullous Pemphigoid Disease Area Index) a été proposé pour mesurer l'activité de la maladie au cours du temps [11]. Ce score mesure l'altération de la peau et des muqueuses attribués à la maladie.



Figure 1. *Pemphigoïde bulleuse: bulles tendues sur peau érythémateuse [10]*

Sur le plan histologique, une biopsie cutanée en faveur d'une PB se présente par une bulle cutanée montrant un décollement par clivage entre le derme et l'épidermique *(figure 2).* Il s'associe un infiltrat inflammatoire composé de polynucléaires éosinophiles, de lymphocytes et de macrophages [12] .

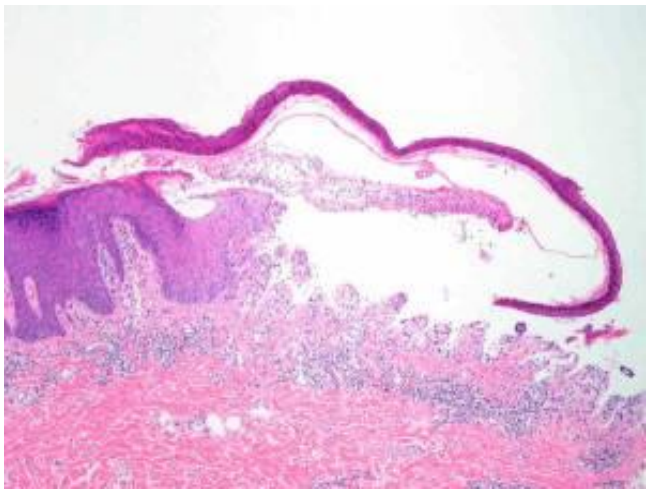


Figure 2. *Bulle sous-épidermique avec clivage dermo-épidermique [10]*

Les critères immunologiques finalisent le diagnostic positif d'une PB par un examen en immunofluorescence directe (IFD) d'une biopsie de peau qui met en évidence des dépôts linéaires d'IgG et parfois de C3 le long de la jonction dermo-épidermique *(figure 3)* [13]. L'IFD est complétée par l'examen du sérum en immunofluorescence indirecte (IFI) recherchant la présence d'autoanticorps circulants anti-épidermique (anticorps anti-JDE, anticorps anti-membrane des kératinocytes) [14] et l'examen du sérum en immunotransfert ou ELISA permettant de détecter la présence des autoanticorps anti-BP230 et les anti-BP180 [15] .

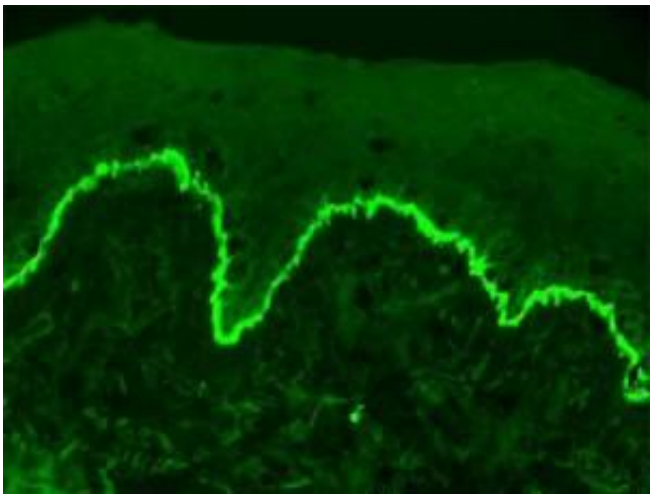


Figure 3. *Dépôts d'anticorps le long de la jonction dermo-épidermique [10]*

III. Physiopathologie

Pour comprendre la physiopathologie de la PB, il est essentiel de connaître l'organisation de la jonction dermo-épidermique (JDE).

III.1 Architecture et organisation de la JDE

La jonction dermo-épidermique est composée sur le plan ultrastructurel des trois compartiments suivants *(figure 4)* [16] :

- de la membrane cytoplasmique basale des kératinocytes de la couche basale présentant des complexes d'adhésions appelés hémidesmosomes. Ces derniers sont des structures servant d'une part de site d'insertion pour les filaments de kératines (tonofilaments) à la membrane cytoplasmique basale et, d'autre part, ils assurent une liaison avec la membrane basale sous-jacente [17] [18].

- de la membrane basale comportant deux zones distinctes : la lamina lucida (côté épiderme) et de la lamina densa (côté derme). La lamina lucida apparaît comme une zone optiquement vide,

contrairement à la lamina densa qui est une zone électron-dense. La membrane basale est constituée de nombreuses protéines comme les laminines, la fibronectine, et le collagène de type IV. Elle semble être reliée aux hémidesmosomes par des structures filamenteuses appelées filaments d'ancrage correspondant vraisemblablement au domaine extracellulaire de BP180 [18].

- du derme papillaire superficiel avec le réseau fibreux dermique. Les fibres d'ancrage de la lamina densa sont des structures filamenteuses qui forment des boucles avec des demi-cercles, assurant la cohésion de la JDE avec le derme papillaire sous-jacent [17].

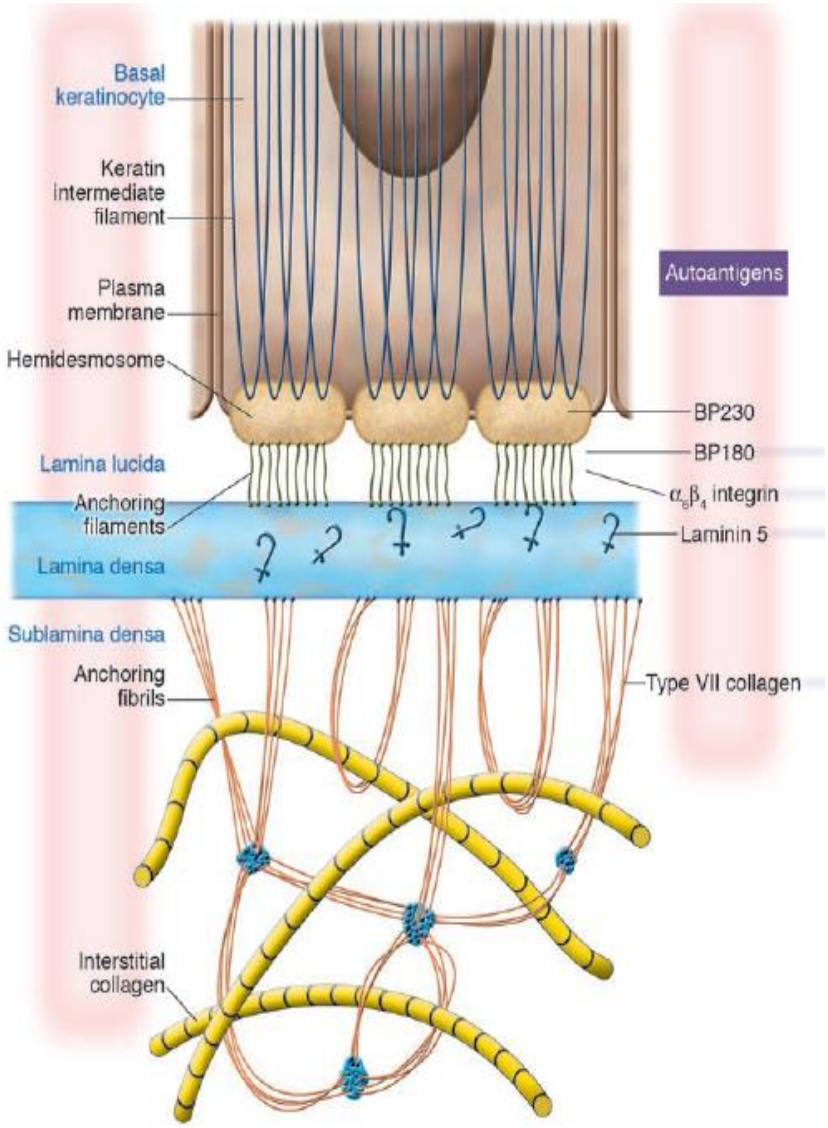


Figure 4.*Modèle schématique de la membrane basale épidermique [16].*

III.2 Antigène BP230 et Antigène BP180

Dans la PB, les auto-anticorps circulants dans le sérum des patients sont dirigés contre deux antigènes cibles, l'antigène BP230 et l'antigène BP180.

Le premier antigène mis en évidence dans la pemphigoïde bulleuse est l'antigène BP230 *(figure 5*). D'un poids moléculaire de 230 KDa, il est reconnu par 60% des sérums de malades atteints de PB [19]. Le gène codant la protéine BP230 est situé sur le bras court du chromosome 6 en position 6p11-12 [20]. Il s'agit d'une protéine de structure située dans la portion intracellulaire de l'hémidesmosome, au niveau de la plaque d'ancrage [21]. Il appartient à la famille des plakines, protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette et contient une région centrale α-helical coiled-coil limitée par deux domaines globulaires à l'extrémité. Les domaines N-terminale et C-terminale de BP 230 sont très importants dans les interactions avec les autres protéines transmembranaires de l'hémidesmosome comme BP180, la chaine β4 de l'intégrine α6β4 et les filaments intermédiaires de kératine. En revanche, le domaine centrale α-helical coiled-coil joue probablement un rôle dans la stabilité structurale [22].

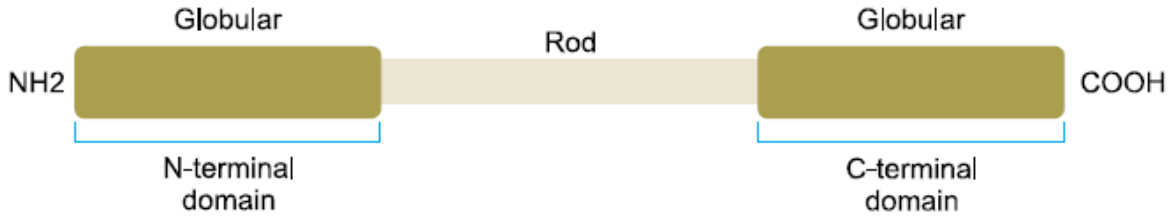


Figure 5. *Structure du BP230 humain [22]*

Le deuxième auto-anticorps identifié dans la PB est une protéine trans-membranaire de l'hémidesmosome appelée BP180 ou collagène XVII, de poids moléculaire total de 180 KDa [19]. La protéïne BP180 possède un domaine intra-cytoplasmique associé à la plaque de l'hémidesmosome, une région transmembranaire et un domaine extracellulaire situé à la partie inférieure de la lamina lucida et participant à la formation des filaments d'ancrage reliant les hémidesmosomes à la lamina densa. Le gène codant pour cette protéine est situé sur le bras long du chromosome10 (10q24.3) [23].

Le domaine extracellulaire de BP180 contient 15 domaines collagéniques et 16 domaines non-collagéniques de longueurs variables. Cette protéine comporte plusieurs sites antigéniques, le site antigénique majeur de BP180 est localisé sur une région non-collagénique juxta- et extra-membranaire, de 73 acides aminés, appelée NC16A [24] (*figure 6*).

La partie N16A est reconnue par la majorité (90%) des sérums de malades atteints de PB [24]. Elle est également reconnue par les sérums de patients atteints de pemphigoïde cicatricielle et de pemphigoïde gravidis [25].

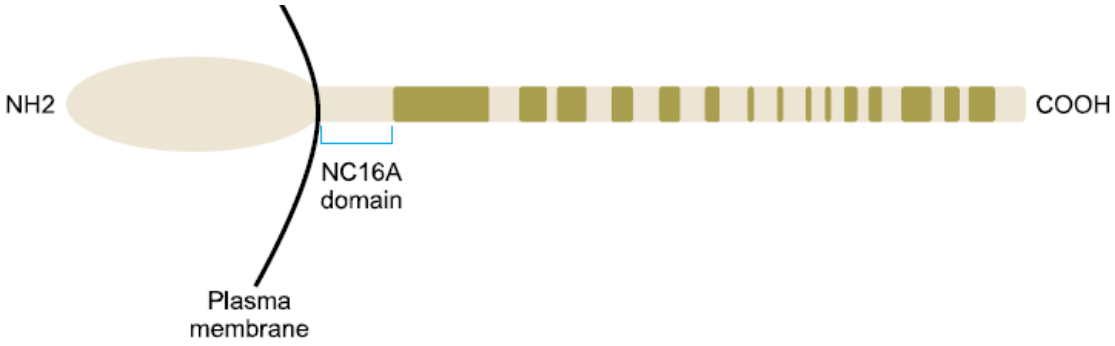


Figure 6. *Structure du BP180 humain [22]*

III.3 Rôle physiopathologique des auto-anticorps dans la pemphigoïde bulleuse

La compréhension de la physiopathologie de la PB a bien évolué notamment grâce à la génération d'un modèle murin de PB. Ce modèle est produit par l'injection d'anticorps de lapin chez des souris nouveau-nées reconnaissant la partie extracellulaire de BP180, ce qui produit une séparation dermo-épidermique avec décollements bulleux similaires à ceux observés dans la PB humaine [26] .Selon ce modèle, la formation de la bulle sous-épidermique se fait par une cascade d'événements. La fixation d'IgG anti-BP180 sur le BP180 active la voie classique et la voie alternative du complément [27] [28]. Cette activation du complément induit une activation et une dégranulation des mastocytes. Les mastocytes vont induire à leur tour le recrutement des neutrophiles qui secrètent les enzymes protéolytiques telles que l'élastase, la MMP-9 et les activateurs du plasminogène. La plasmine va activer la MMP-9 qui inactive l'inhibiteur de l'élastase (α1–protéinase), ce qui permet à l'élastase de dégrader le BP180 et de produire les bulles sous-épidermiques. Des fragments issus du clivage du BP180 par l'élastase peuvent servir comme agents chemoattractants pour les neutrophiles, ce qui amplifie la cascade inflammatoire [29] [16]. La partie extracellulaire de BP180 semble donc jouer un rôle initiateur critique dans le développement de la maladie puisqu'elle est plus accessible pour les autoanticorps, contrairement à la partie cytoplasmique du BP180 et du BP230 qui pourraient contribuer aux dégâts tissulaires dans une phase secondaire [30].

Toutefois, il a été montré dans des modèles d'études sur kératinocytes humains et sur des cellules de peau humaine en culture que dans la PB, des autoanticorps sont capables sous certaines conditions d'induire la formation de la bulle sans l'activation du système du

complément. En effet les IgG et les IgE anti-BP180 peuvent provoquer l'internalisation du BP180, probablement par des macropinocytoces issus des cellules de la membrane basale ce qui réduit le pouvoir d'adhésion de ces cellules [31]. Après fixation de l'IgG ou de l'IgE anti BP180 sur le BP180, les kératinocytes secrètent les cytokines IL6 et IL8 qui recrutent et activent des neutrophiles d'une manière indépendante du complément [32].

En outre, il a été montré que la présence de fortes concentrations d'IgE anti-BP180 et anti-BP230 chez presque 70% des patients atteints de PB. In vivo, ces IgE anti BP180 ne sont pas liées à la membrane basale mais sont présentes à la surface des mastocytes et des éosinophiles. Elles pourraient être impliquées dans la fixation des produits de dégradation du BP180 ce qui activent les mastocytes et les éosinophiles et ainsi amplifier la réaction inflammatoire [33] [34].

IV. Traitement

Le choix du traitement à adopter dans la PB repose sur plusieurs critères, permettant de calmer l'éruption bulleuse tout en limitant les effets secondaires du traitement, surtout chez les personnes âgées.

IV.1 Corticothérapie générale et locale

La corticothérapie générale constitue le traitement le plus utilisé dans les différents pays. Elle est efficace, mais comporte plusieurs effets secondaires chez les sujets âgés dont notamment l'insuffisance surrénalienne.

En France, la corticothérapie locale est actuellement le traitement de référence de la PB [35]. En effet, une étude a montré que la corticothérapie locale permettait de contrôler les lésions en diminuant le nombre d'effets secondaires en comparaison à la corticothérapie générale [36]. Le traitement de première ligne de la PB est désormais le propionate de clobétasol à la dose journalière de 20 à 30 g. L'évaluation de l'efficacité du traitement est avant tout clinique visant surtout l'obtention d'un simple contrôle de l'inflammation cutanée. Après le contrôle clinique de la maladie, le traitement est suivi d'une façon mensuelle pendant 3 mois, puis espacé (bimestriel ou trimestriel) jusqu'à l'arrêt du traitement [37].

IV.2 Traitements immunosuppresseurs

Les traitements immunosuppresseurs peuvent être utilisés en cas de corticodépendance, ou de corticorésistance, ou lorsque la corticothérapie est contre-indiquée.

Les traitements immunosuppresseurs les plus courants visent à contrôler la réponse immunitaire. Le méthotrexate a un effet anti-inflammatoire par inhibition du chimiotactisme

des polynucléaires. L'Azathioprine empêche la prolifération des cellules responsables de l'amplification de la réponse immunitaire. l'Imurel et le mycophénolate mofétil (Cellcept) inhibent la multiplication des lymphocytes B et T activés et des macrophages, et bloquent la synthèse d'anticorps ce qui réduit l'activation des cellules NK et la production d'IL-2 [38].
Actuellement, plusieurs travaux se focalisent sur l'étude de plusieurs cytokines dans la PB comme des cibles thérapeutiques futures. Toutefois, bien que ces travaux confirment la forte présence de certaines cytokines dans la PB comme l'IL-17, l'IL-23 ou l'IFN$_\gamma$, aucun traitement n'a encore été adopté.

Chapitre 2 : La réponse inflammatoire dans la pemphigoïde bulleuse

I. Généralités

L'inflammation est à la base d'une grande variété de processus physiologiques et pathologiques. La réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression dans le but de maintenir leur intégrité. Les causes classiques à l'origine d'une réaction inflammatoire sont soit des facteurs exogènes se traduisant par une infection bactérienne ou virale, soit des facteurs endogènes comme une lésion, un endommagement de tissus. Les infections bactériennes ou virales sont associées dans la majorité des cas à un déséquilibre du microbiome. Dans le cas normal ce microbiome joue un rôle important dans l'homéostasie tissulaire grâce aux bactéries commensales qui synthétisent des peptides antimicrobiens, qui sont des véritables antibiotiques naturels qui combattent les bactéries pathogènes et les tiennent à l'écart, ou encore par leur rôle dans l'activation des cellules de la réponse immunitaire innée. D'où le rôle du déséquilibre du microbiome dans certaines maladies inflammatoires de la peau comme la dermatite atopique ou le psoriasis [39] [40] [41] [42].
La reconnaissance des agents exogènes ou endogènes se fait par un type de récepteur particulier appelé PRR (Pattern-recognition receptors) exprimé par les cellules immunes innées comme les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les neutrophiles, mais aussi les cellules du système immunitaire adaptatif et les cellules épithéliales. Ces récepteurs sont capables de reconnaitre des motifs bien conservés spécifiques de pathogènes (appelés PAMP

(Pathogen-associated molecular patterns) et des motifs provenant de cellules abimées ou mortes appelés DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) [43] .

Il existe plusieurs familles de PRRs qui sont séparées en PRR membranaires et PRR cytoplasmiques. Parmi les PRR membranaires, il y a les récepteurs aux lectines de type C (CLR) et les TLRs (Toll Like Receptors). Les CLRs reconnaissent des polysaccharides et des glycopeptides spécifiques à la surface des bactéries et des champignons, dont font partie les récepteurs aux mannoses (MMR pour Macrophage Mannose Receptor). Les TLR sont parmi les PRRs les plus étudiés. Ils comportent une dizaine de membres identifiés chez l'Homme, et sont exprimés par de nombreux types cellulaires. Chacun d'entre eux reconnait des ligands très spécifiques. Par exemple, le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi bactérienne est reconnu par le TLR-4 et les ARN viraux sont reconnus par le TLR-3 et le TLR-7. Les PRRs cytoplasmiques regroupent les RLRs (les récepteurs de type RIG-1) et les NLRs (les récepteurs de type NOD). Les RLRs et les NLRs sont des protéines cytosoliques qui contrôlent les molécules intracellulaires microbiennes et les signaux de danger. Les RLR reconnaissent des ARN double-brin dérivés de virus. Les NLR regroupent trois grandes sous-familles de récepteurs (NOD, NALP et NAID) qui reconnaissent exclusivement les composants bactériens [43] [44].

La réponse inflammatoire peut être divisée en trois phases [45] :

- Une phase d'initiation qui fait suite à la reconnaissance du signal de danger et qui met en jeu essentiellement les cellules de l'immunité innée.
- Une phase d'amplification avec le recrutement des cellules du système immunitaire sur le site inflammatoire et l'amplification de la réaction par l'ensemble des cellules effectrices de l'inflammation.
- Une phase de résolution et de réparation qui élimine l'agent initiateur de l'inflammation et qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

La nature du développement de chacune de ces trois phases conditionne le type de la réaction inflammatoire. Elle peut être une réaction inflammatoire aiguë qui est la réponse typique du système immunitaire inné caractérisée par une durée limitée dans le temps et par un rétablissement, à terme, de l'homéostasie tissulaire. Ou, au contraire, une réaction inflammatoire chronique qui se traduit par l'échec de l'élimination de l'élément inducteur de la réponse par le système mis en place, ce qui laisse persister le processus inflammatoire. La réaction inflammatoire peut alors durer des semaines, voire des années [40].

Il a été démontré que l'inflammation chronique serait un acteur important dans le mécanisme pathologique de nombreuses maladies, notamment le cancer, l'athérosclérose, l'asthme, les

maladies neurodégénératives et certaines maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde [40] [46].

Dans la PB, la réaction inflammatoire joue un rôle majeur dans le mécanisme de la maladie conduisant à la formation de la bulle.

II. Mécanismes de l'inflammation dans la pemphigoïde bulleuse

La phase d'initiation de la réponse inflammatoire dans la PB commence par la perte de l'auto-tolérance. Les causes de cette non–tolérance ne sont pas entièrement comprises dans la PB. Après la rupture de tolérance, les autoantigènes BP180 et BP230 sont présentés par les cellules présentatrices d'antigénes via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) exprimés à leur surface aux cellules T CD4+. À la reconnaissance de ces épitopes, Les lymphocytes T CD4+ vont déclencher la libération de diverses cytokines et par conséquent activer les lymphocytes B pour produire les autoanticorps. La fixation de ces autoanticorps sur leurs cibles va activer la cascade du complément ce qui induit la dégranulation des mastocytes par des dérivés des fragments C3a et C5a du système complément [47].

Comme introduit ci-dessus, la phase d'amplification de la réaction inflammatoire dans la PB est déclenchée par la dégranulation des mastocytes, qui sont les premières cellules impliquées dans cette cascade inflammatoire. Ces cellules vont activer le recrutement des neutrophiles par deux mécanismes, soit directement via des cytokines spécifiques soit indirectement en activant tout d'abord les macrophages qui amplifient ensuite l'infiltration des neutrophiles en créant une boucle d'amplification avec les mastocytes [48].

La dernière phase de cette cascade d'inflammation a pour but d'éliminer et de neutraliser l'agent déclencheur de la réponse inflammatoire c'est-à-dire les autoanticorps. Elle fait intervenir les enzymes protéolytiques, principalement l'élastase, la collagénase, les activateurs du plasminogène, la plasmine ainsi que la MMP-2, la MMP-9 et la MMP-13. Ces enzymes sont majoritairement secrétées par les neutrophiles. En dégradant le BP180 et le BP230 , ils vont participer à la rupture de la cohésion de JDE ce qui est à l'origine de la formation de la bulle [16] [47].

D'autre part, la protéine PB180 ou ses produits de dégradation seront fixés par des IgE anti BP180 exprimés à la surface des éosinophiles. Ceci induit l'activation des éosinophiles et favorise la sécrétion par ces cellules de plusieurs médiateurs de l'inflammation dont principalement la MMP-9 [49] [33] [34].

III. Les cellules de l'inflammation

III.1 Les mastocytes

Les mastocytes sont classiquement considérés comme les cellules de l'immunité innée qui agissent comme les premiers acteurs dans plusieurs infections bactériennes et sont aussi impliqués dans la réaction allergique. Ces cellules sont principalement localisées dans les tissus conjonctifs. La peau est l'organe le plus riche en mastocytes, mais tous les autres organes en contiennent à des degrés variables.

Dans la PB, les souris déficientes en mastocytes sont résistantes au développement de la maladie [48], ce qui montre l'importance de ces cellules dans le mécanisme physiopathologique associé à la PB. En effet, les mastocytes sont activés suite à la liaison des fragments C3a et C5a de la cascade du complément ce qui déclenche la réaction inflammatoire par la sécrétion de médiateurs proinflammatoires et chimiotactiques qui sont en majorité stockés dans des granules et libérés par dégranulation. On y retrouve l'histamine, le leukotriene B4, l'IL-1, l'IL-2, l'IL-5, l'IL-6, et le TNFα. Ces cytokines présentes à des fortes concentrations dans le liquide de bulle peuvent contribuer directement ou indirectement via les macrophages au recrutement des neutrophiles [50] [51] [48].

La dégranulation des mastocytes est associée aussi à une dégradation de la matrice. En effet, la sérine protéase spécifique des mastocytes (la chymase) active la MMP-9, ce qui suggère que les mastocytes peuvent contribuer à l'altération de la membrane en clivant les protéines de structure dans la JDE ou encore en activant la MMP-9 [48].

III.2 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les premiers leucocytes circulants à migrer sur le site de l'inflammation et constituent la première ligne de défense contre l'agent pathogène. Après des étapes successives d'adhésion et de diapédèse, ils vont migrer jusqu'au site de l'infection, guidés par un gradient chimiotactique.

Les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie de la PB puisque les souris déficientes en neutrophiles ne développent pas de bulles [48] . Dans le modèle murin de PB produit par l'injection d'anticorps de lapin reconnaissant la partie extracellulaire de BP180 et du BP230 murin, la réaction inflammatoire suit la réaction autoimmune selon une cascade bien définie conduisant à la formation de la bulle. En effet, la fixation des autoanticorps sur leurs cibles va activer la cascade du complément ce qui induit l'activation des mastocytes et par la suite le recrutement des neutrophiles soit via des cytokines spécifiques soit en activant tout

d'abord les macrophages qui amplifient ensuite l'infiltration des neutrophiles en créant une boucle d'amplification avec les mastocytes. Une fois recrutés, les neutrophiles produisent une variété d'enzymes protéolytiques comme l'élastase, la cathepsine G, les activateurs du plasminogène, la plasmine, la MMP-2, la MMP-9 et la MMP-13. L'ensemble de ces enzymes participe à la rupture de la cohésion de la JDE, et par conséquent à la formation de la bulle [52].*(figure 7)*

Toutefois dans ce modèle murin de PB, les neutrophiles sont les cellules prédominantes sur le site lésionnel alors que chez les patients, ce sont les éosinophiles qui prédominent dans l'infiltrat inflammatoire [47] . En plus, ce modèle ne permet pas d'expliquer pourquoi certains patients ne développerons qu'une maladie paucibulleuse alors que d'autres progresserons rapidement vers des atteintes cutanée sévères. Ceci suppose que chez l'Homme, la cascade inflammatoire à l'origine de la maladie fait intervenir d'autres cellules inflammatoires dont le rôle n'est pas assez décrit dans le modèle murin de PB comme les éosinophiles et les macrophages. Ces cellules peuvent amplifier la réaction inflammatoire et par conséquent aggraver la maladie.

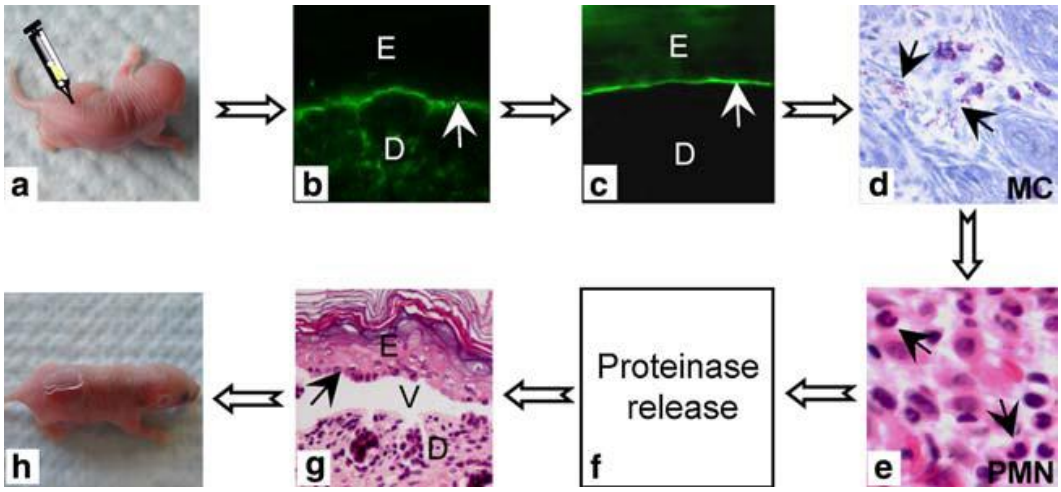


Figure 7. *Le mécanisme de formation de la bulle dans le modèle murin de PB [52]*

III.3 Les macrophages

Les macrophages jouent un rôle central dans les mécanismes de défense aux infections et assurent aussi un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, le remodelage et la réparation des tissus après un épisode inflammatoire. Suite à un signal de danger, les macrophages issus des monocytes circulants interviennent en compléments des macrophages résidents. Dans la PB, les souris déficientes en macrophages développent une forme atténuée

de la maladie, tout en préservation l'activation des mastocytes [48] . Ces données montrent que dans la cascade inflammatoire associée à la PB, ces cellules agissent en aval des mastocytes. En effet, les macrophages initialement activés par les mastocytes, amplifient l'infiltration des neutrophiles dans le tissu, en créant une boucle d'amplification avec les mastocytes. En effet , les macrophages secrètent différents médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le TNFα, et des enzymes protéolytiques qui participent soit dans le recrutement des neutrophiles, soit directement dans la dégradation de la membrane basale [48] . Les mécanismes qui régulent les fonctions des macrophages par les mastocytes dans cette réaction sont encore mal connus, ainsi que le rôle exact des macrophages dans la PB [53] [54] [48]. D'autant plus que ces cellules peuvent avoir différentes fonctions puisqu'elles disposent d'une plasticité exceptionnelle qui dépend de leur localisation et des signaux présents dans leur environnement [55] .

III.4 Les lymphocytes

Il existe deux populations de lymphocytes, les lymphocytes B et les lymphocytes T dont les rôles sont différents. Les lymphocytes B sont impliqués dans la synthèse d'anticorps et dans l'immunité spécifique. Les lymphocytes T se divisent en deux classes, les lymphocytes CD4+ et les lymphocytes CD8+ (cytotoxiques). Les lymphocytes CD8+ sont impliquées dans l'élimination des cellules anormales ou infectées par les pathogènes intracellulaires. En revanche, Les lymphocytes CD4+ jouent un rôle régulateur majeur dans la réponse immunitaire et inflammatoire par la libération de cytokines spécifiques. Différentes sous populations de lymphocytes T ont été identifiées : les cellules T helper précursors (Thp) qui se différencient, selon l'environnement cytokinique, en cellules de type Th1 avec un profil de sécrétion pro-inflammatoire (IL-2, IFN-γ, TNF-α), ou Th2 avec un profil anti-inflammatoire (IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10). Les cellules de type Th1 ou Th2 produisent des cytokines qui inhibent mutuellement l'activité et la prolifération de l'autre type cellulaire, ce qui définit une balance Th1/Th2. Au niveau pathologique, un déséquilibre orienté vers un type cellulaire Th1 ou Th2 a été mis en évidence dans la plupart des maladies inflammatoires ou autoimmunes.

Dans la PB, suite à la rupture de la tolérance, les lymphocytes B produisent les autoanticorps. Toutefois bien que ces lymphocytes soient présents dans la zone lésionnelle de la peau des patients, leur implication dans la cascade inflammatoire n'est pas démontrée puisque les souris déficientes en lymphocytes B sont capables d'induire la séparation de la JDE et donc la formation de la bulle. Donc ces cellules ne sont probablement impliqués dans la cascade inflammatoire que dans les stades précoces [48] [47]. La présence des lymphocytes T est aussi mise en évidence chez les patients PB mais dans le modèle murin de la maladie , leur rôle n'est

pas élucidé dans la cascade inflammatoire associée à la PB et conduisant à la formation de la bulle [48]. Leur rôle pourrait être associé à l'amplification de la réponse immune Th2 et dans la réponse inflammatoire Th1, en créant des boucles d'autoamplification. Le type de polarisation lymphocytaire impliqué dans la pathogenèse de PB est controversé. En effet, plusieurs études montrent la présence de profils cytokiniques de type Th1 et Th2 chez les patients PB, d'où ils concluent la présence d'une balance Th1/Th2 dans cette maladie [56]. D'autres montrent la prédominance des cytokines comme l'IL-5 spécifiques de la polarisation Th2 [57], de plus ces cytokines sont responsables de la conversion isotypique des plasmocytes vers la synthèse d'IgE, et du recrutement des éosinophiles vers les sites de l'inflammation, ce qui caractérisent la réaction inflammatoire associée à la PB chez l'Homme [57] .

Plus récemment, de nouvelles données suggèrent l'implication d'une autre sous-population de lymphocytes T CD4+, les Th17, dans le mécanisme physiopathologique de la maladie [58]. L'IL-17 est impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires et autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de crohn et le psoriasis [59]. En effet, des études immunohistochimiques montrent qu' au niveau du site lésionnel de la peau des patients PB plusieurs cellules expriment l'IL-17 [60] . D'autre part , cette cytokine joue un rôle important dans l'initiation et la maintenance de plusieurs maladies autoimmunes et inflammatoires en stimulant la production de plusieurs cytokines proinflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 et des métalloprotéïases comme la MMP-9 et la MMP-13 [59] . Elle permet le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles qui sont les cellules inflammatoires clés dans la pathogenèse de la PB [58].

III.5 Les kératinocytes

En plus des cellules immunes, les cellules résidentes de la peau comme les kératinocytes peuvent jouer un rôle dans la réaction inflammatoire associée à la PB. En effet les kératinocytes humains en culture traités avec des IgG anti BP180 et anti BP230 sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et l'IL-6 [61]. Ces cytokines jouent un rôle chemoattractant pour les neutrophiles. Les kératinocytes pourraient donc initier un mécanisme indépendant de l'activation du système du complément dans la cascade inflammatoire associée à la PB [61].

IV. Les médiateurs de l'inflammation

IV.1 Les Cytokines

Les cellules décrites ci-dessus, participent dans la cascade inflammatoire associée à la PB en sécrétant une variété de cytokines qui servent à activer et à recruter d'autres cellules sur le site inflammatoire. Les mastocytes et les macrophages produisent essentiellement l'IL-1, l'Il-2, l'IL-5, l'IL-6 et le TNFα. Ces cytokines sont présentes à des fortes concentrations dans le sérum des patients et/ou le liquide de bulle (LB) et ils servent comme des agents chemoatractants pour les neutrophiles et les éosinophiles [62] [63]. En plus l'IL-6 produite aussi par les kératinocytes, active la différentiation des lymphocytes B et favorise ainsi la production d'anticorps [62]. Quelques études ont montré aussi une augmentation de l'IL-4 dans le sérum des patients PB et dans le LB [50] [57] . Cette cytokine serait majoritairement secrétée par les lymphocytes T activés et elle serait impliquée dans la production des IgE et des autoanticoprs en synergie avec l'IL-5 [62]. Le LB contient aussi des fortes concentrations d'IL-10 et d'IL-8. L'IL-10 serait majoritairement produite par les lymphocytes T CD4+ et aurait un effet sur la croissance et l'activation des mastocytes par contre l'IL-8 est produite aussi bien par les cellules inflammatoires comme les mastocytes et les macrophages que par les cellules résidentes comme les kératinocytes. Son rôle est essentiellement le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles [62]. L'IFNγ est aussi présent à des fortes concentrations dans le LB, il est principalement secrété par les cellules de type Th1, les CD8+, les NK et les cellules présentatrices d'antigéne. Il favorise l'expression de l'IL-1 et de l'IL-8 [62].

Récemment l'IL17 , l'IL-22, l'IL-23 et le TGF β ont été mises en évidence dans le sérum de patients et/ou le LB suggérant une orientation Th17 dans la PB [59] [63] [64] .

Il a été démontré la présence d'un taux élevé de la chimiokine CXCL10 dans le sérum des patients PB. Ce taux est corrélé à la sévérité de la maladie [65]. Cette cytokine appartient à la famille des cytokines inflammatoires. Elle est exprimée par plusieurs cellules immunitaires comme les neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes et d'autres cellules résidentes au niveau de la peau comme les kératinocytes et les fibroblastes, son rôle serait principalement chemoattractant pour les autres cellules [66] [67] [68].

IV.2 Les protéases

Les souris déficientes en élastase et en MMP-9 sont résistantes au développement de la PB [54] [69]. Ces protéases, produites par les neutrophiles et les éosinophiles sont les enzymes clés dans la dégradation de la matrice extracellulaire et du BP180. En effet, il se produit une

interaction entre la MMP-9, l'élastase et le système du plasminogène durant les événements protéolytiques se produisant dans la maladie [29]. Dans les premiers stades, la MMP-9 est activé principalement par le plasmine formé par le tPA (tissu Plasminogen Activator) et/ou l'uPA (urokinase Plasminogen Activator) et secondairement par la chymase, une protéase produite par les mastocytes. La MMP-9 activé, inactive l'inhibiteur l'α-protéïnase qui est l'inhibiteur physiologique de l'élastase, ce qui va permettre une activité illimitée de cette protéase [46] .

L'élastase joue un rôle important dans la phase terminale de la cascade conduisant à la formation de la bulle. Cette enzyme se trouve à des fortes concentrations dans le LB sous la forme active. Elle clive le domaine extracellulaire du BP180 au niveau du domaine NC14A, générant un peptide de 12 kDa, qui est chemoattractant pour les neutrophiles ce qui amplifie la boucle inflammatoire dans la PB [70] [71].

Chapitre 3: La chimiokine CXCL10

CXCL10 est présent à des taux élevés dans le sérum de patients PB. Ce taux est corrélé à la sévérité de la maladie [65] . En plus cette chimiokine , ainsi que son récepteur CXCR3 semblent être impliqués dans la physiopathologie de plusieurs maladies autoimmunes [66]. D'où l'intérêt de l'étude du rôle de cette chimiokine dans la PB.

I. Caractérisation

Les chimiokines sont des protéines de faibles poids moléculaires (~ 8 à 10 kDa) secrétées et dotées de pouvoir chimioattractant. Les chimiokines sont classées en quatre sous familles (CXC, CC, CX3C, et C) en se basant sur le nombre et la position de 4 résidus cystéines conservés dans la partie aminoterminale. La sous-famille CXC se caractérise par la présence de deux résidus cystéines de l'extrémité N-terminale qui sont séparées par un seul résidu (acide aminé X quelconque). Cette sous-famille des chimiokines CXC est divisée en deux sous-groupes, selon la présence ou l'absence d'un motif particulier de 3 acides aminés que sont l'acide glutamique, la leucine et l'arginine (motif ELR) situé en amont des cystéines conservées, ce motif joue un rôle important dans la spécificité de liaison des chimiokines à leurs récepteurs. On définit ainsi les chimiokines CXC ELR+ et les chimiokines CXC ELR-.

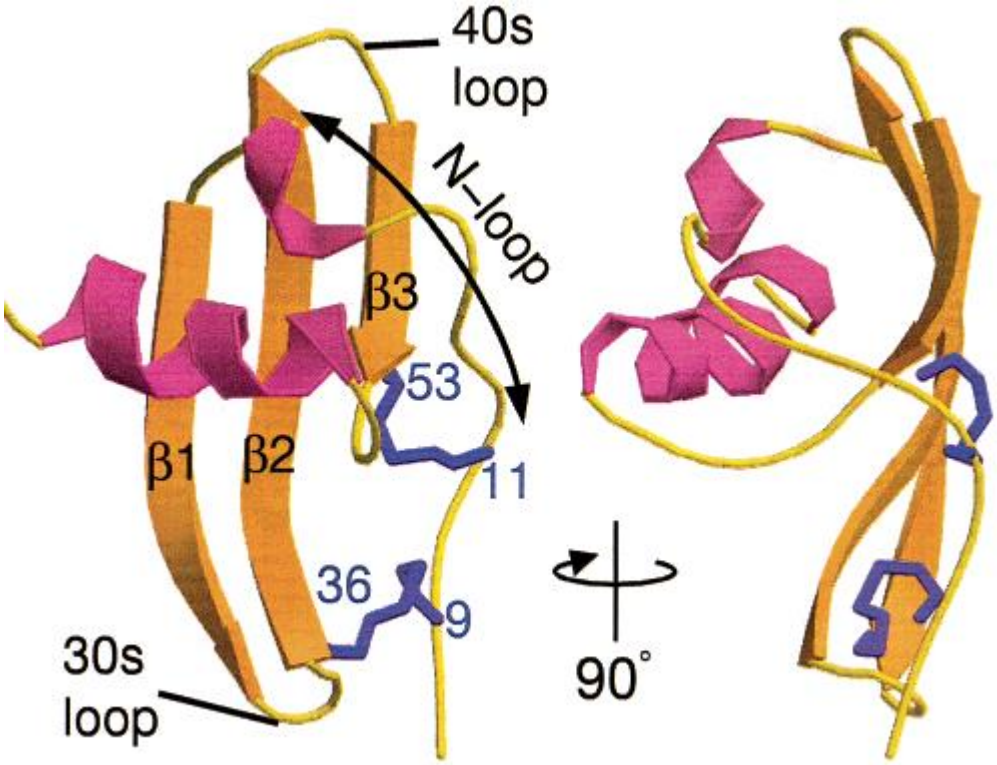
Les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 sont membres de la sous-famille CXC ELR-. Elles sont produites en réponse à l'IFNγ. Elles partagent un même récepteur CXCR3 et sont fortement associés à la réponse immunitaire de type Th1 [72].

La chimiokine CXCL10, initialement appelée IP-10 pour 10kDa interferon γ-induced protein, peut aussi être induite par le TNF α produit par les cellules de type Th1 [66]. CXCL10 est une chimiokine CXC ELR-, ce qui lui confère un pouvoir de chimiotactisme pour les lymphocytes T et B. Ce chimiotactisme peut expliquer le rôle important de cette chimiokine dans la réponse inflammatoire associée à la PB. En effet, la présence de cette chimiokine créé une boucle d'autoamplification qui perpétue la réaction inflammatoire toutefois elle pourrait avoir un effet différent, en participant via son récepteur CXCR3 au processus de réparation tissulaire [73] [74].

Le gène codant pour cette chimiokine est localisé sur le chromosome 4, dans la région q21. Il comprend quatre exons et trois introns [74] . La transcription de CXCL10 est régulée par une région de 230 nucléotides en amont du site du début de transcription. Cette zone contient plusieurs sites de fixation de régulateurs de transcription comme le NF-kB, l'activator protein 1 , l'ISRE (interferon-stimulated response element) et le HS (Heat shock) factors [75] .

Le produit de traduction primaire du gène correspond à une protéine de 12 kDa formée de 98 acides aminés dont un peptide signal de 21 acides aminés. Après clivage du peptide signal , la protéine secrétée a une taille de 10kDa correspondant à 77 acides aminés [74] .

De point de vue structurel, CXCL10 présente une structure typique composée d'une première boucle du côté N-terminale, suivi de trois feuillets bêta antiparallèles emballés contre une boucle du côté C-terminale. Deux paires de résidus cystéines (9-36 et 11-53) forment des ponts disulfures entre les feuillets β1-β2 et β2- ß3 *(Figure 8)*. La conformation de la boucle qui en résulte donne une spécificité de liaison à leurs récepteurs CXCR3 [76].



.

Figure 8. *Structure tridimensionelle de CXCL10 [76]*

II. Cellules productrices de CXCL10

CXCL10 est sécrétée par plusieurs types cellulaires incluant les lymphocytes T, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules NK et les kératinocytes. Une fois sécrétée, CXCL10 joue un rôle de chimioattractant en attirant sur le site de l'inflammation d'autres cellules qui expriment son récepteur CXCR3, tels que les lymphocytes T activés, les cellules NK et les monocytes. Les Lymphocytes T activés sont la principale source de sécrétion de CXCL10 et représentent la population cellulaire principale attirée par CXCL10 [75]. Les lymphocytes T CD4 + et CD8 + expriment aussi bien le ligand que le récepteur, mais ce sont surtout les cellules CD4 + Th1 qui sécrètent cette chimiokine [74] [77].

La sécrétion de CXCL10 est dépendante de l'IFN-γ. Dans les tissus, les cellules recrutés de type Th1 sont responsables de l'expression de CXCL10, soit directement en produisant de l'IFN-γ et du TNF α, soit indirectement en interagissant tout d'abord avec les macrophages qui secrètent à leur tour l'IFN-γ [66] [77] . Ces cytokines activent la sécrétion de CXCL10 par plusieurs types cellulaires ce qui crée une boucle d'autoamplification qui perpétue la réaction inflammatoire (*figure 9*) [66]. La sécrétion de CXCL10 par différentes cellules comme les cellules endothéliales , les fibroblastes ou les adipocytes sous l'influence de l'IFNγ caractérise

la présence de cette chimiokine dans les liquides périphériques comme un marqueur de réponse autoimmune , surtout que le taux de CXCL10 est souvent corrélé à l'activité de plusieurs maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde , le lupus ou le diabète de type I [66]

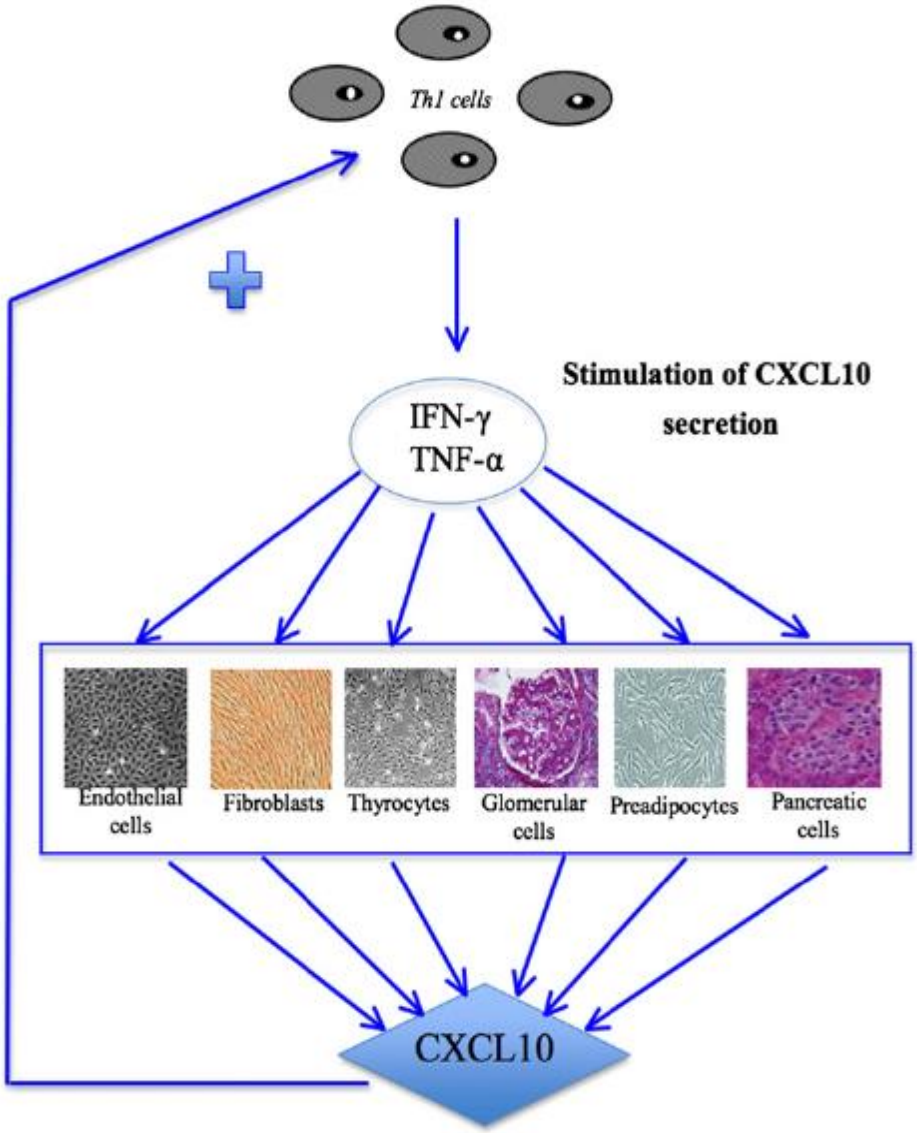


Figure 9. *La boucle d'auto-amplification de l'expression de CXCL10 [66]*

III.Les récepteurs de CXCL10

III.1 Caractérisation

Les chimiokines exercent leur activité en interagissant avec des récepteurs exprimés à la surface des cellules. La nomenclature de ces récepteurs suit celle des ligands qu'ils reconnaissent. Ainsi, les récepteurs correspondant aux chimiokines du groupe CXC seront appelés CXCR. Il existe 7 récepteurs appartenant à cette classe (CXCR1 à CXCR7). Ils présentent tous une

structure tertiaire semblable. Ce sont des récepteurs transmembranaires à sept hélices, comprenant une extrémité amino-terminale extracellulaire, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G et font donc partie de la superfamille des GPCR (G Protein Coupled Receptor) [76] [78] [79] ***(****Figure 10****)***.

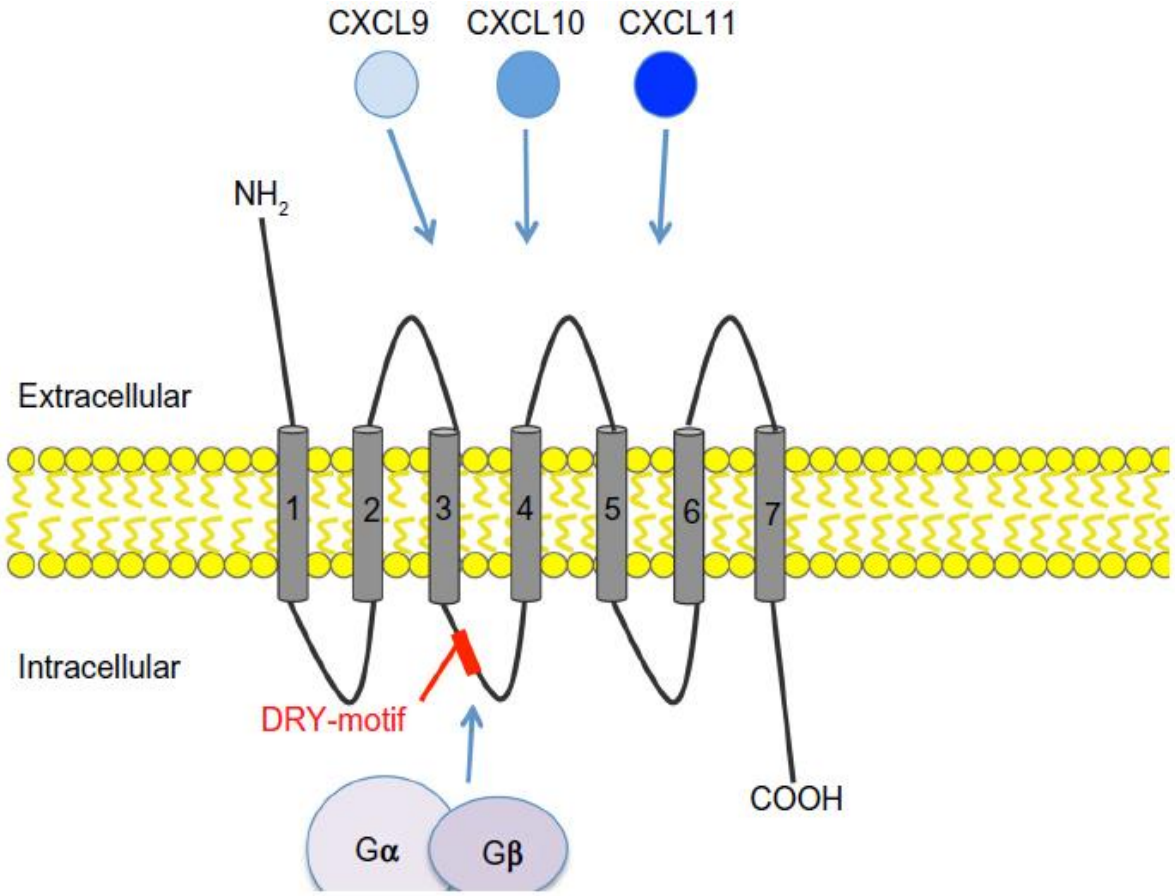


Figure 10. *Structure du récepteur CXCR3 [79]*

Ils sont aussi caractérisés par la présence de deux résidus cystéines dans la seconde et la troisième boucle extracellulaire de l'extrémité N-terminale. Ces résidus cystéine forment un pont disulfure essentiel pour la fixation du ligand et l'activation du récepteur. La deuxième boucle intracellulaire possède un motif DRY qui est nécessaire pour l'activation des protéines G [79] [80] ***(****Figure 10****)*** .

CXCR3 est le récepteur des chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL4 [81]. Le gène codant pour ce récepteur est localisé sur le chromosome X dans la région q13, contrairement aux autres gènes codant pour des récepteurs de la même famille qui sont tous localisés sur le

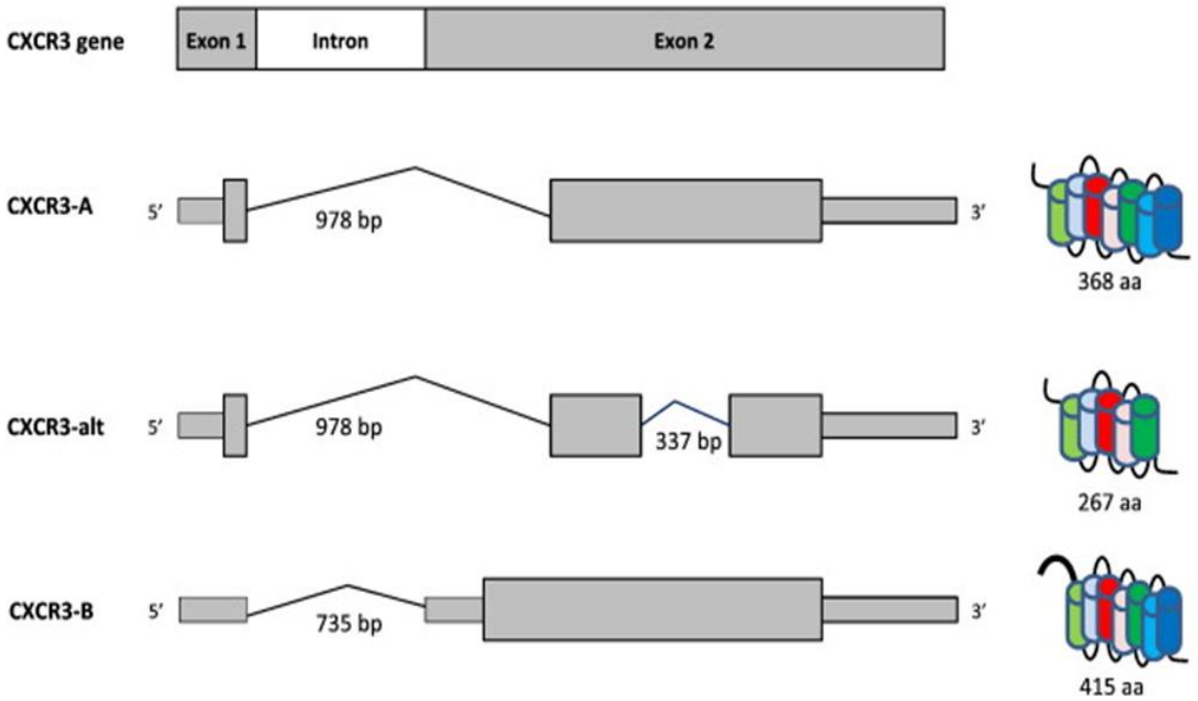


Figure 11. *Représentation schématique des 3 isoformes de CXCR3 [80]*

chromosome 2 [80] . Un épissage alternatif du gène CXCR3 humain génère 3 isoformes qui sont CXCR3-A, CXCR3-B et CXCR3-alt [80] [81] *(Figure 11).*

La plupart des cellules, expriment principalement le CXCR3-A qui est la première isoforme identifiée. CXCR3-A résulte de l'épissage d'un seul intron. Le premier exon code pour 4 acides aminés et le deuxième exon code les 364 acides aminés restants. Il est couplé à la sous-unité Gαi de la protéine G [80] . CXCR3-B est composé de 415 acides aminés, il est produit par l'épissage d'un seul intron. Cet épissage alternatif produit un prolongement de 52 acides aminés du côté N-terminal et le reste de la séquence est commun à CXCR3-A. Les cellules endothéliales expriment uniquement l'isoforme CXCR3-B qui est couplé à la sous-unité Gαs de la protéine G, initiant une cascade de signalisation différente de celle activée par CXCR3-A. La plupart des cellules exprimant le CXCR3-A présentent une faible expression de CXCR3-B [80] [81] .

L'activation de CXCR3-A induit un chimiotactisme et une prolifération dans différents types cellulaires alors que l'activation du CXCR3-B inhibe la migration, la prolifération et induit l'apoptose [80] [81].

Une troisième isoforme identifiée plus tard a été nommé CXCR3-alt. Elle résulte de l'épissage de 2 introns. Elle est composée de 267 acides aminés. Sa séquence nucléotidique est identique à celle de CXCR3-A, à l'exception des bases manquantes 696-1032 dans l'exon 2. Elle ne

possède que 4 ou 5 domaines transmembranaires et montre des différences structurelles et fonctionnelles considérables par rapport aux deux autres isoformes, à cause du décalage du cadre de lecture. Toutefois, CXCR3-alt conserve une affinité pour CXCL11, mais pas pour les autres ligands de CXCR3 [80] [81].

III.2 Signalisation

La plupart des récepteurs de chimiokines transmettent des signaux cellulaires à travers les protéines G composés des sous unités α, β et γ. La liaison d'une chimiokine à son récepteur active la sous-unité α de régulation et conduit en conséquence à la dissociation du complexe catalytique formé par les sous-unités ßy.

CXCR3 active différentes voies de signalisation selon ses isoformes *(figure 12).*

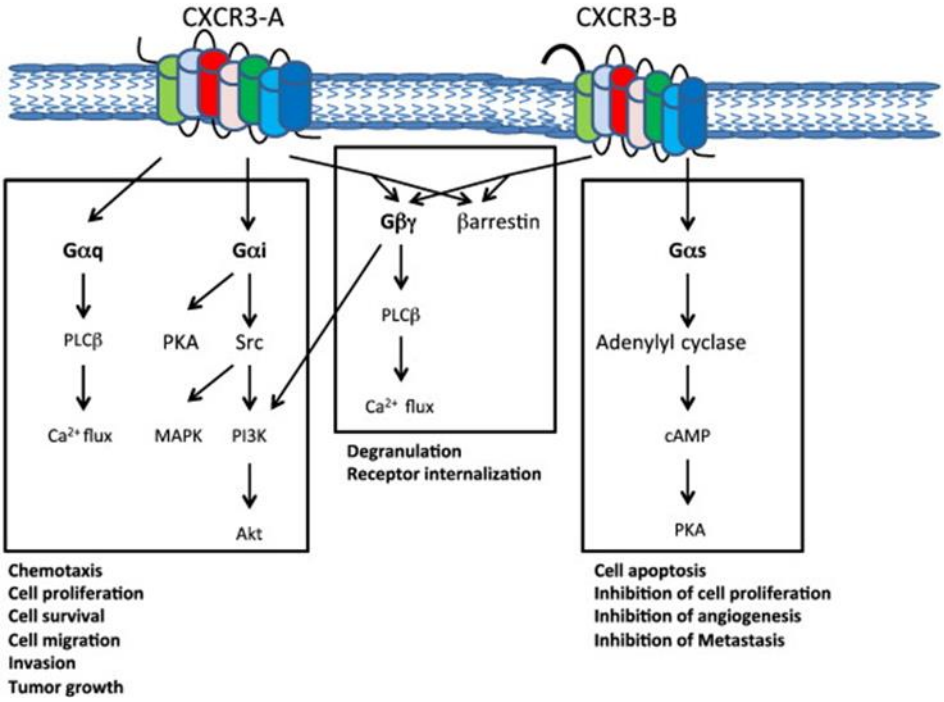


Figure 12. *Représentation schématique des voies de signalisation du récepteur CXCR3 [80]*

L'isoforme CXCR3-A est associée à la sous-unité Gαq ou Gαi. La liaison des ligands de CXCR3-A (CXCL11 / CXCL10 / CXCL9) conduit à l'activation des voies de signalisation MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), (ERK1/2,p38,JNK) et PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) / Akt, qui induisent une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et une activation de la prolifération cellulaire, aussi bien dans les cellules normales que cancéreuses [80] [82].

En revanche, la fixation des ligands de CXCR3-B (CXCL11 / CXCL10 / CXCL9 / CXCL4) favorise la dissociation de la protéine Gs en sous unités Gαs et Gβγ. Gαs activé active à son tour l'adénylcyclase, qui augmente la concentration de l'AMPc et active la voie PKA. L'augmentation de la concentration de l'AMPc inhibe la signalisation ERK1/2. Cette cascade de signalisation active l'apoptose et inhibe la prolifération cellulaire et l'angiogenèse [80] [82]. CXCR3-alt est connu pour être co-exprimé avec CXCR3-A, mais à un niveau très faible. Il déclenche la signalisation des voies ERK1 / 2 et la phosphorylation de Akt, mais n'a pas les mêmes effets que CXCR3-A [80] [82] .

Par conséquent, la balance entre les signaux prolifératifs induits par CXCR3-A par rapport à l'inhibition de la croissance induite par CXCR3-B dicterait le résultat final de toute réponse immunitaire dans un microenvironnement inflammatoire particulier.

IV. Principales pathologies impliquant CXCL10 et ses récepteurs

Compte tenu de sa nature pléiotropique, le récepteur CXCR3 ainsi que ses ligands sont impliqués dans plusieurs pathologies liées à l'angiogenèse, l'inflammation, le cancer ainsi que les troubles du système immunitaire. Les ligands CXCR3 sont en effet caractérisés par leur position unique dans le croisement de l'immunité et de l'angiogenèse, par conséquent ils jouent un rôle exceptionnel dans la santé, la maladie et la thérapie.

IV.1 Inflammation et maladies autoimmunes

Le récepteur CXCR3 et ses ligands sont responsables du recrutement des cellules immunitaires circulantes activées dans les zones de l'inflammation. Bien que ce mécanisme soit essentiel pour la défense de l'hôte contre les infections, il peut également contribuer à l'induction et à l'exacerbation de réactions inflammatoires pouvant induire ou aggraver des pathologies autoimmunes [68] . Ainsi l'implication de CXCR3 et de son ligand CXCL10 a été confirmé dans plusieurs maladies inflammatoires autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus érythémateux (LE), le diabète de type II, la thyroïdite autoimmune, la sclérose systémique et la sclérose multiple [66] [68] .

Lors du développement d'une réponse autoimmune dans la polyarthrite rhumatoïde ou dans le lupus érythémateux, les cytokines de types Th1 principalement l'IFN-γ, induisent l'expression de CXCR3 à la surface des lymphocytes et des cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes. Ces cellules vont être chemoattractées par les chimiokines CXCL10, CXCL9 et CXCL11 qui sont produites par les cellules résidentes comme les fibroblastes synoviaux dans la PR. Une fois recrutée au niveau du site inflammatoire, ces cellules, qui sont majoritairement

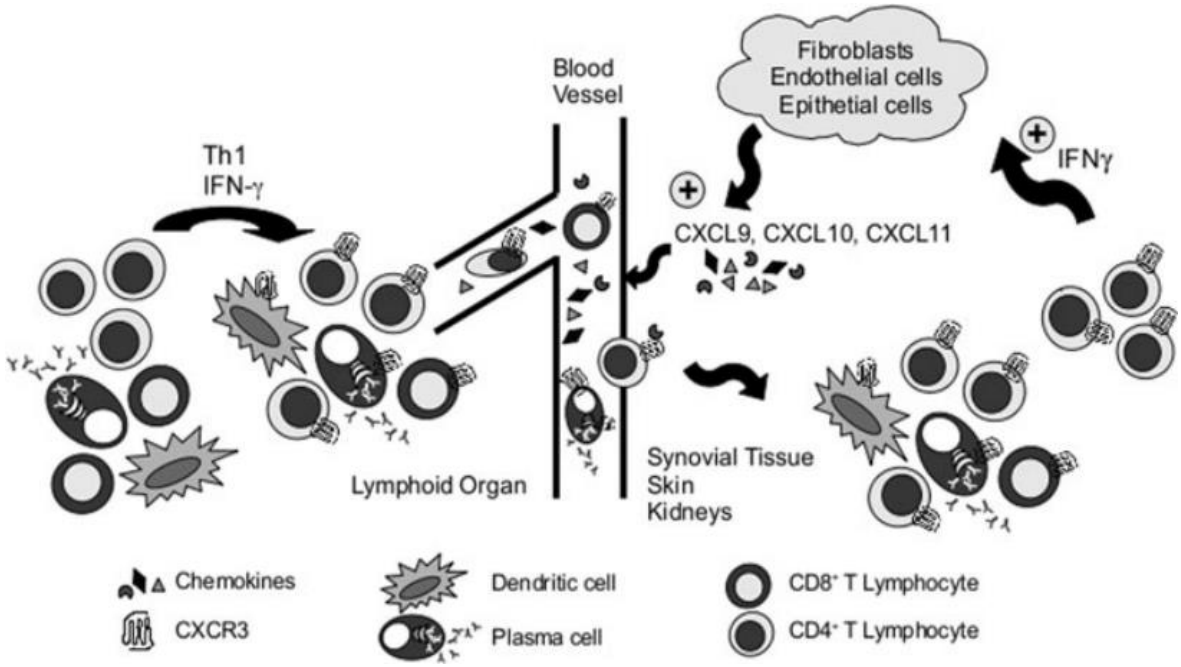


Figure 13. *Amplification de la réaction inflammatoire dans la PR via l'axe CXCR3 [83]*

des cellules de type Th1, vont produire de l'IFN-γ ce qui stimule la production de CXCL10 et les autres ligands de CXCR3 par les cellules résidentes [68]. Ceci crée une boucle d'autoamplification qui contribue à la pérennisation de l'inflammation dans les maladies autoimmunes [83] *(Figure 13)* .

De plus, l'expression de CXCL10 dans le sérum et dans les tissus est augmentée dans diverses autres pathologies autoimmunes comme la sclérose systémique ou la sclérose multiple [67] .

Vu l'importance de l'axe CXCR3-CXCL10 dans ces pathologies inflammatoires autoimmunes, il est considéré comme une cible thérapeutique future. En effet, dans la PR l'utilisation de molécules thérapeutiques tels que des inhibiteurs du TNF-α inhibent la production des ligands de CXCR3 par les fibroblastes synoviaux et altèrent l'infiltration des cellules CXCR3 + [66] .

Chapitre 4 : La métalloprotéinase matricielle 9

I. Caractérisation

Les métalloprotéinases constituent un groupe d'enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire, ainsi que des composants non-matriciels. Il existe 23 MMPs humaines

différentes identifiées [84] . Ces MMP sont des endopeptidases dépendantes du zinc qui peuvent être classées en quatre sous-groupes, basés sur leur spécificité de substrat et leur structure primaire : les collagénases qui dégradent le collagène de type I et III, les gélatinases qui dégradent les composants de la membrane basale et partiellement le collagène de type IV, les stromélysines qui ont une large spécificité de substrat (protéoglycane, laminine, fibronectine, gélatine et le collagène de la membrane basale) et les métalloprotéinases membranaires (MT-MMP) qui dégradent de nombreux composants de la matrice extracellulaire et qui sont capables d'activer d'autres MMPs [85] .

Plusieurs propriétés sont nécessaires à une enzyme protéolytique pour appartenir à la famille des MMPs [86] :

- la présence d'un atome de zinc dans leur site actif et le besoin de calcium pour que l'enzyme soit active
- une synthèse et une sécrétion sous forme de zymogène inactif (ProMMP)
- la présence d'un profil caractéristique en domaines conservés
- la capacité à dégrader un ou plusieurs substrats matriciels
- la régulation de leur activité par des inhibiteurs tissulaires spécifiques.

Les MMPs jouent un rôle important dans de nombreux événements physiologiques aussi bien au niveau cellulaire, comme dans la migration et l'apoptose, que tissulaire, dans la cicatrisation et le remodelage matriciel [87] . Plus particulièrement, la MMP-9 apparait comme un acteur majeur dans plusieurs maladies inflammatoires et autoimmunes. Elle est capable avec la MMP-2 à hydrolyser le collagène de type IV natif, le principal composant des membranes basales. La MMP-9 appartient donc au sous-groupe des gélatinases, et est aussi appelée gélatinase B. Le gène de la MMP-9 est situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme. Il comporte 13 exons codant une protéine de 92 kDa fortement glycosylée. La protéine synthétisée comporte des domaines communs à toutes les MMPs : le pré-domaine ou peptide signal, le pro-domaine, le domaine catalytique et enfin le domaine C-terminal de type hémopexine [88] . Le peptide signal est composé de 17 à 20 acides aminés, permettant de cibler la molécule vers le milieu extracellulaire. Il est ensuite clivé avant la sécrétion de l'enzyme latente [89] . Le pro-domaine est capable de maintenir le zymogène sous une forme latente peu ou pas active par la cystéine contenue dans sa séquence qui interagit avec l'atome de zinc présent dans le site actif. Le domaine catalytique contient une séquence consensus avec trois résidus histidine nécessaires à la liaison du zinc et à l'activité protéolytique. Il contient en plus trois domaines « fibronectine de type II » qui lui servent à lier le collagène et la gélatine. Le domaine hémopexine, quant à lui, est nécessaire au clivage de la triple hélice des collagènes interstitiels. Enfin le domaine C-

terminal de type hémopexine est impliqué dans la spécificité du substrat *(Figure 14)* [88] [89] [90] .

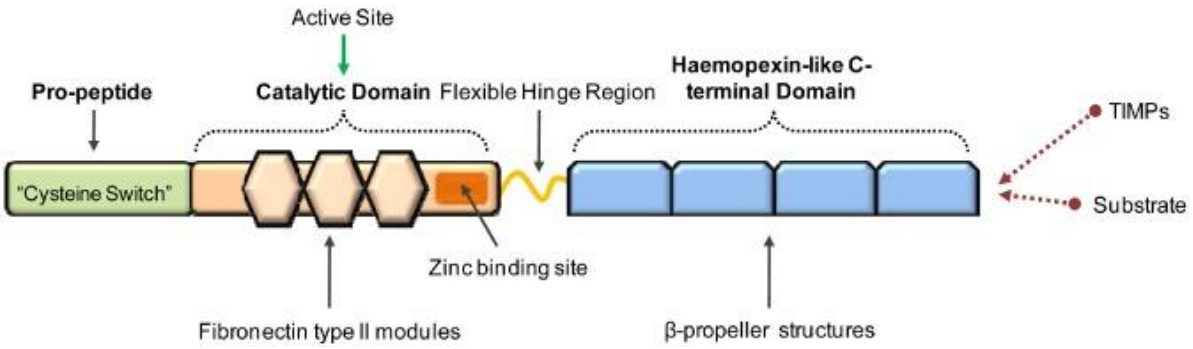


Figure 14. *Structure des métalloprotéases [90]*

II. Expression

La MMP-9 est secrétée par plusieurs types cellulaires parmi lesquels on note les PMNs [89] , les lymphocytes [92], les macrophages [93], les polynucléaires éosinophiles [94], les mastocytes [95], les cellules NK [96], et les cellules dendritiques [97] .

Dans le contexte inflammatoire, la MMP-9 joue un rôle important dans la migration des PMNs par la dégradation du collagène IV des membranes basales des vaisseaux sanguins. La MMP-9 est stockée dans les granules tertiaires à l'intérieur des PMNs qui la libèrent au moment de la migration transendothéliale [91]. L'induction de la production et de la sécrétion de la MMP-9 se fait via des stimuli cellulaire inflammatoires (stress oxydatif, cytokines, chimiokines, esters de phorbol) [88] . La chimiokine CXCL10 augmente l'expression de la MMP-9 notamment dans le cas de cancer gastrique et cancer du côlon [98] [99]. Par ailleurs et dans un contexte pathologique particulier, la MMP-9 peut cliver certaines chimiokines, notamment CXCL10, afin de modifier leur activité comme dans le cas de la sclérose multiple [100] [101].

III. Régulation

La régulation de l'activité de la MMP-9 est complexe, elle s'effectue au niveau de la transcription du gène, de l'activation et de l'inhibition de l'enzyme.

III.1 Régulation transcriptionnelle

La séquence promotrice du gène humain de la MMP-9 contient plusieurs séquences consensus en amont de la boite TATA qui contrôlent la transcription basale et induisent l'expression du gène. On y trouve notamment des sites de fixation pour NF-kB qui sont nécessaires pour une surexpression du gène induit par le TNF-α , un site de fixation pour AP-1 qui semble être nécessaire mais non suffisant pour l'induction de la transcription en réponse à des cytokines et des esters de phorbol, et un autre site pour PEA3 [88]. Pour augmenter la stabilisation de l'ARNm de la MMP-9, la protéine HuR faisant partie de la famille de protéine ELAV (embrionic lethal adnorrnal vision-like), peut lier le transcrit de la MMP-9 et assurer sa stabilisation [102].

III.2 Activation

La MMP-9 est sécrétée sous la forme de proenzyme qui peut être activée, par le clivage de son propeptide. Ce clivage peut être fait par plusieurs protéases, y compris les MMPs ce qui déclenche ainsi une cascade d'activation (*Figure 15*). Les activateurs directs de la MMP-9 sont la matrilysine-l (MMP-7), la matrilysine-2 (MMP-26), la collagénase de fibroblaste (MMP-l), la collagénase-3 (MMP-13), la stromélysine-l (MMP-3), la stromélysine-2 (MMP-l0) et la gélatinase A (MMP-2) [103]. Il est à noter que la liaison de la proMMP-9 à son substrat lui confère une activité enzymatique sans qu'il y ait clivage du propeptide. Parmi les protéases capables de déclencher le réseau d'activation des MMP, deux familles sont d'une importance particulière: le système d'activateur du plasminogène/plasmine et les MT-MMP. Le plasminogène peut être converti en plasmine par l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) ou par l'urokinase. La plasmine peut alors activer d'autres MMP et la cascade d'activation qui s'en suit se termine par l'activation de la MMP-9. Pour leur part, les MT-MMP peuvent activer des MMP telles que la MMP-2 et la MMP-13, qui activent à leur tour la MMP-9 *(Figure 15)* [88][103] [104].

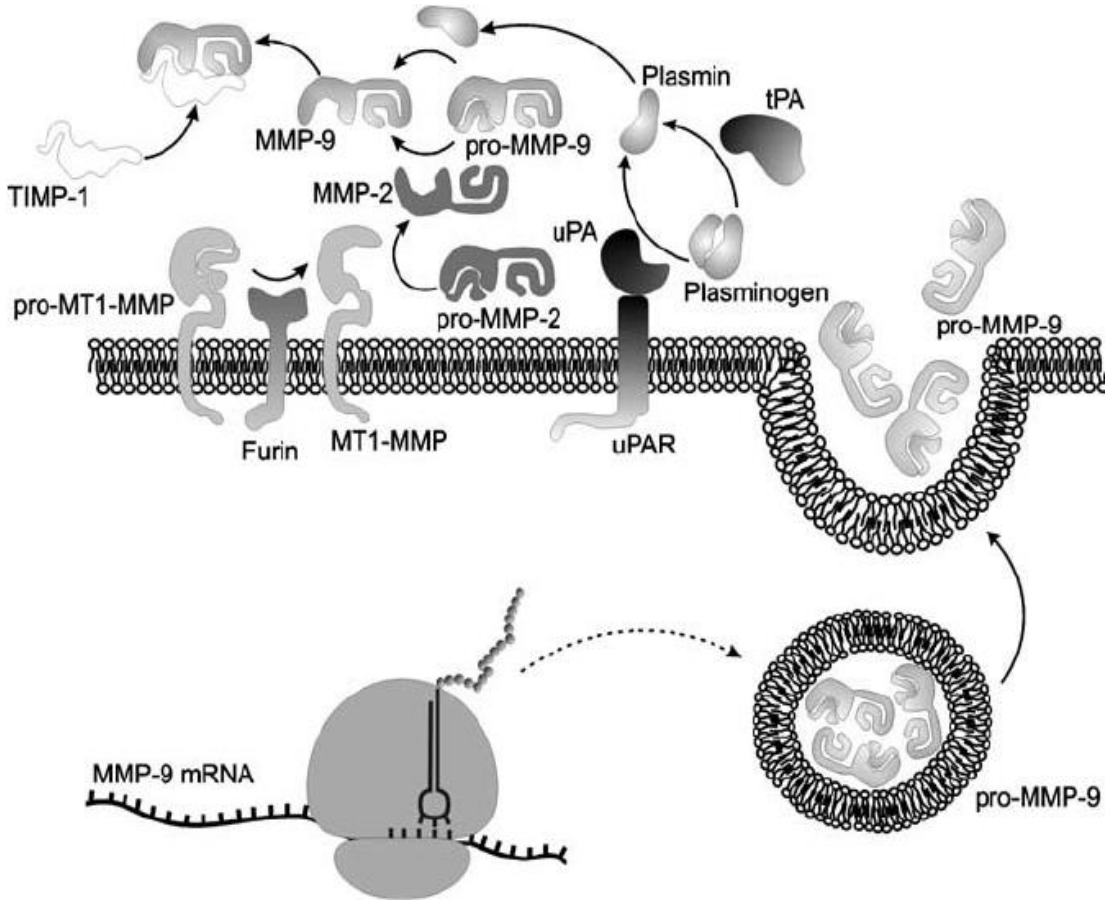


Figure 15. *Représentation schématique de la synthése et de l'activation de la MMP-9 [104]*

III.3 Inhibition

L'activité de la MMP-9 extracellulaire peut être modulée par son inhibition ou sa dégradation. Mis à part les inhibiteurs plasmatiques tels que le α2-macroglobuline, l'enzyme peut être inhibée par la famille des TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases). Parmi les quatre membres de cette famille (TIMP-1 à -4), c'est le TIMP-1 (protéine de 28 kDa) qui possède une grande affinité pour MMP-9, il forme un complexe avec l'enzyme bloquant ainsi l'accès au site contenant le zinc [103] [88].

Le niveau extracellulaire de la MMP-9 peut aussi être contrôlé par endocytose. En effet des récepteurs LRP (LDL receptor-related protein) se lient à la MMP-9 en induisant une endocytose rapide, suivie d'une dégradation lysosomale [105].

IV. Rôle de la MMP-9 dans certaines pathologies

IV.1 Inflammation

Le cancer est l'une des pathologies les plus couramment associés à la MMP-9. Cette protéase joue un rôle central dans la progression tumorale et la formation des métastases en raison de son rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans l'angiogenèse [88]. Il faut noter que l'expression de la MMP-9 n'est pas limitée aux cellules tumorales. En effet, son expression est également retrouvée dans les cellules stromales environnantes et dans les cellules inflammatoires, principalement les neutrophiles et les macrophages.

L'inflammation est considérée comme une étape nécessaire de la progression tumorale. Elle régule l'angiogenèse, l'invasion et la métastase. Dans ce contexte, La MMP-9 joue un rôle clé dans l'amplification de la réaction immunitaire [88]. En effet, des cytokines proinflammatoires comme le TNFα, IL-1β, IL-6 et le TGFβ augmentent l'expression de la MMP-9 dans les cellules tumorales humaines. D'autre part, la MMP-9 active les cytokines proinflammatoires, le TNFα et l'IL-1β et augmente l'activité d'autres chimiokines comme CXCL1, CXCL4, CXCL7 CXCL8 et CXCL10 [88]. De plus, suite à l'interaction entre certaines chimiokines et leurs récepteurs comme le CXCL8 avec le récepteur CXCR2, la MMP-9 est libérée par les neutrophiles. Elle participe ainsi à la réaction inflammatoire associée à la tumeur [88].

IV.2 La pemphigoïde bulleuse

La MMP-9 joue un rôle clé dans la physiopathologie de la PB puisque des souris déficientes en MMP-9 ne sont pas capables de développer une PB. Ces souris présentent un dépôt d'anticorps au niveau de la membrane basale et un recrutement de neutrophiles au niveau de la peau. Toutefois, malgré l'influx des cellules immunes l'examen histologique ne montre pas de séparation entre le derme et l'épiderme [69].

Ceci montre que la MMP-9 agit au niveau de stades tardifs du mécanisme pathologique de la maladie. En effet, après l'activation des neutrophiles, ces cellules libèrent l'élastase et la pro-MMP9. La proMMP-9 serait principalement activée par la plasmine formée par le tPA (tissu Plasminogen Activator) et/ou l'uPA (urokinase Plasminogen Activator) et secondairement par la chymase, une protéase produite par les mastocytes. La MMP-9 activée, inactive l'α-protéinase qui est l'inhibiteur physiologique de l'élastase en le clivant, ce qui va permettre une activité illimitée de cette protéase (*Figure 16*) [47] [106].

D'autres études montrent que dans la PB, la MMP-9 serait également secrétée par les macrophages. Elle serait impliquée dans le recrutement de neutrophiles et dans la dégradation de la membrane basale [48].

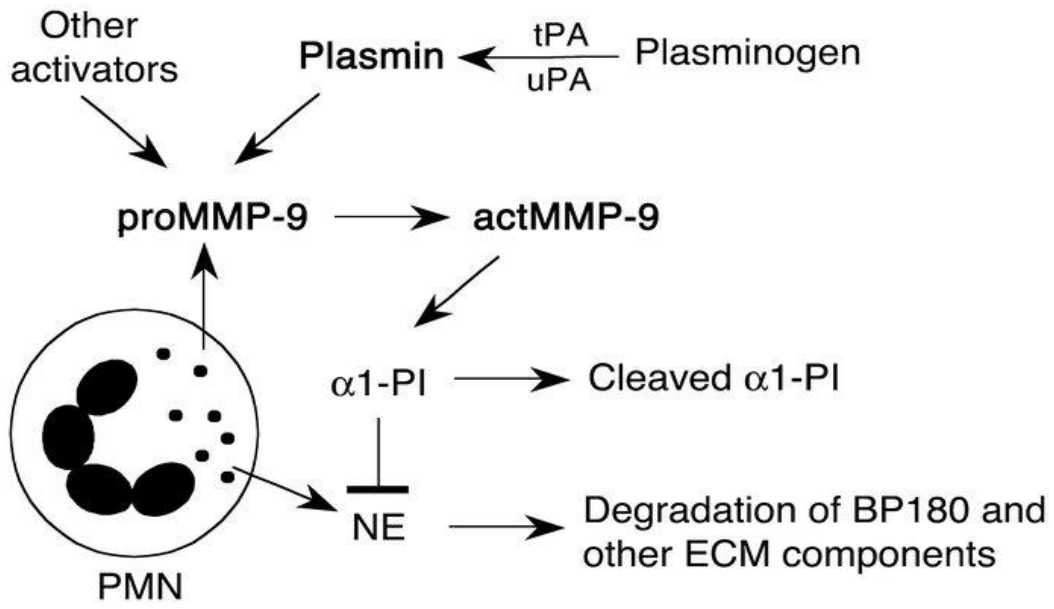


***Figure 16**. Mécanisme d'activation de la MMP-9 dans la PB [106]*

Chapitre 5. Macrophages et polarisation

Les macrophages jouent un rôle central dans les mécanismes de défense immunitaires mais assurent aussi un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, le remodelage et la réparation des tissus après un épisode inflammatoire.

I. Origine

Les macrophages sont issus de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui apparaissent dès les premiers stades embryonnaires. Les CSH sont capables d'auto-renouvèlement, afin de maintenir un stock permanent dans la moelle osseuse. Grâce à l'influence de leur microenvironnement, les précurseurs myéloïdes vont produire toutes les cellules du sang à l'exception des lymphocytes. Parmi ces précurseurs, on retrouve les lymphoblastes, les

érythroblastes, les myéloblastes, les mégacaryoblastes et les monoblastes. Les monoblastes donneront ensuite les promonocytes qui se différencieront en monocytes [107].

Les monocytes dérivent du progéniteur granulomonocytaire (GMP ou GM-CFU pour Colony Forming Unit Granulocytes Macrophage). Ces derniers, en présence de CSF-2 (GM-CSF), de CSF-1 (M-CSF), d'IL-3 ou d'IL-6 deviendront tout d'abord des monoblastes puis des promonocytes et enfin des monocytes. Les monocytes matures quitteront alors la moelle osseuse pour migrer vers la circulation. Ils représentent 5 à 10% des leucocytes présents dans le sang. Ils vont être recrutées ensuite vers les tissu grâce à des gradients de chimiokines, et quittent le flux sanguin selon le processus de diapédèse. Durant cette extravasation, le monocyte va se différencier en macrophage ou en cellules dendritiques (*figure 17*) [107] [55].

D'autres macrophages dits résidents sont présents en permanence dans les tissus. Ils sont ainsi capables d'intervenir rapidement en cas d'invasion microbienne ou d'accumulation de débris [107] . Récemment des nouvelles données indiquent que tous les macrophages ne sont pas tous dérivés des monocytes issus de la moelle osseuse. En effet, certains macrophages dérivent de précurseurs embryonnaires distincts des monocytes [108]. Les Macrophages spécifiques du tissu adulte comme ceux présents dans la microglie du cerveau sont issus du sac vitellin, qui persisteraient au-delà de la période embryonnaire alors que dans la peau et les intestins , les macrophages sont issus des monocytes qui alimentent en permanence ce réservoir de macrophages [109] [110].

Toutefois, au cours d'une inflammation, il est considéré que les monocytes issus de la moelle osseuse sont la principale source de macrophages alors que les macrophages résidents interviennent pour une réponse immunitaire rapide [107] [55] .

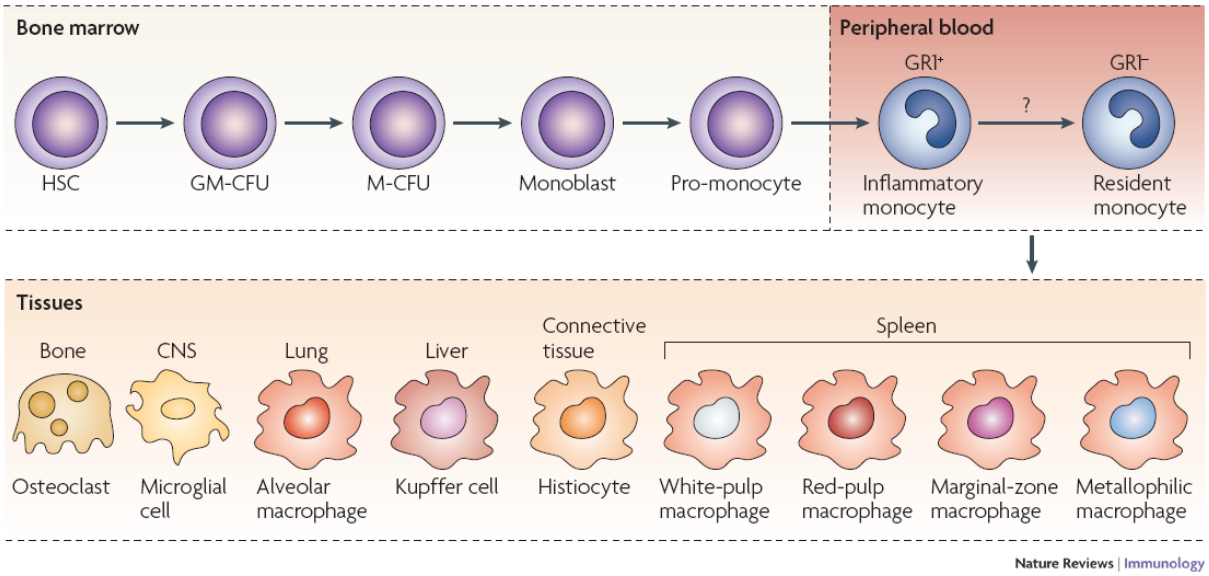


Figure 17. *Origine et hétérogénéité des macrophages [107]*

II. Propriétés fonctionnelles

Les macrophages sont des cellules immunitaires très hétérogènes. Cette hétérogénéité est due au fait que le macrophage adopte une fonction spécifique suivant sa localisation tissulaire. Ainsi, en fonction du tissu où ils se trouvent, les macrophages sont nommés différemment et présentent des morphologies différentes. On distinguera par exemple, dans les poumons, les macrophages alvéolaires, les cellules de Kupffer dans le foie, les ostéoclastes dans l'os, ou bien les cellules microgliales au niveau du système nerveux central (*Figure 17)* [111]. Ils peuvent aussi avoir des fonctions spécifiques au tissu dans lequel il se situe comme par exemple la surveillance immune ou le remodelage osseux pour les ostéoclastes [55].

Les macrophages sont impliqués tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative. Durant la réponse innée, une des fonctions principales des macrophages est la phagocytose. Ils nettoient l'organisme des éléments pathogènes, des cellules apoptotiques, ou nécrotiques, et d'autres débris présents dans les tissus. La phagocytose concernant l'élimination des cellules apoptotiques et des débris issus du remodelage des tissus ne s'accompagne pas de réaction inflammatoire [107]. En revanche, les déchets d'élimination des cellules nécrotiques constituent un signal de danger pour le macrophage qui provoque une expression de facteurs pro-inflammatoires et d'une modification des protéines de surfaces [107].

D'autre part, les macrophages sont impliqués dans le chimiotactisme et l'activation cellulaire. En effet, dans un contexte inflammatoire, le macrophage va amplifier le signal en libérant des

cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-6 ou le TNFα. Pour limiter la réaction inflammatoire et revenir à un état d'homéostasie, des macrophages régulateurs sécrètent les interleukines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-10 et le TGFβ. Dans le cas de remodelage tissulaire ils sécrètent des protéases [112] [107].

Les macrophages interviennent également dans l'immunité adaptative en tant que cellules présentatrices d'antigène, tout comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B. En effet, après phagocytose et digestion d'éléments étrangers, les macrophages exposent les antigènes à leur surface par deux molécules différentes, le CMH de classe I et de classe II. Par la suite Ils stimulent les lymphocytes T (CD4+) et ils déclenchent ainsi une réponse immunitaire spécifique. Initialement il était considéré que les lymphocytes T peuvent se différentier essentiellement en deux sous-populations soit Th1 et Th2. La sous-population Th1 active en retour les macrophages qui augmentent alors leurs capacités de phagocytose en secrétant de l'IL-12, du NO, des métabolites de l'oxygène et des molécules de CMH II. tandis que la sous-population Th2 joue un rôle dans la réponse humorale spécifique, en activant les lymphocytes B [107] .

Les macrophages peuvent aussi être polarisés et mettent en place des réponses spécifiques en fonction de leur environnement.

III. Polarisation

Les macrophages polarisés peuvent être classifiés en 2 groupes : les macrophages de type M1, et les macrophages de type M2, reflétant la nomenclature Th1/Th2 établis pour les lymphocytes. L'activation des macrophages vers un programme M1 est définie comme une « activation classique » alors que la polarisation dite M2 est utilisée initialement pour différentes formes d'activation des macrophages autre que l'activation classique. On parle alors « d'activation alternative » [113] .

III.1 La polarisation pro-inflammatoire de type M1

Les macrophages M1 jouent un rôle essentiel pour la défense de l'organisme contre les pathogènes. Ils se caractérisent par une augmentation de l'activité microbicide, tumoricide, une forte capacité de présentation des antigènes et un fort niveau de sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires.

Cette polarisation des macrophages s'observe en réponse à la stimulation par l'IFNγ et des d'agents microbiens comme le LPS [114]. L'IFNγ est principalement secrété par les cellules de type Th1, les CD8+, les NK et les cellules présentatrices d'antigènes. En réponse à ces

stimulations, les macrophages M1 vont s'activer et sécréter une forte quantité de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-23, l'IL-15, l'IL-18, le TNFα, et l'IL-12. Ils peuvent aussi secréter les chimiokines nécessaires au recrutement des cellules Th1, des neutrophiles et des NK, telles que le CCL15, le CCL20, le CXCL13, le CXCL9, le CXCL10, et CXCL11 permettant ainsi l'amplification de la réponse inflammatoire [115].

De plus, les macrophages de type M1 expriment fortement le CMHII ainsi que des molécules de co-stimulation telles que le CD80 et le CD86, alors qu'ils n'expriment que faiblement le CD206 et le FCγRII (CD32). Ils expriment aussi des niveaux élevés de la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) qui est induite par l'IFNγ. Cette enzyme permet la conversion de la L-arginine en L-citruline et en NO, qui est un radical libre très toxique pour les bactéries (*figure 18)* [115].

III.2 La polarisation anti-inflammatoire de type M2

Les macrophages de type M2 jouent un rôle crucial dans l'inflammation. Mais à l'inverse des M1 qui sont très actifs dans la lutte antibactérienne, les M2 jouent un rôle dans l'étape terminale de l'inflammation, dans la régulation de la réponse immune, et sont impliqués dans la phase de réparation tissulaire.

On distingue trois groupes de macrophages M2: M2a, M2b et M2c. En 2007 un nouveau sous-groupe nommé M2d a été mis en évidence. Ces macrophages possèdent un profil similaire aux Macrophages Associés aux Tumeurs (TAM) présents dans les cancers [116] et ont des propriétés pro-angiogéniques impliquées dans la cicatrisation [117].

III.2.1 M2a

Les macrophages sont différenciés en une polarisation de type M2a suite à leur stimulation par les interleukines IL-4 ou IL-13. Ces interleukines sont principalement produites par les cellules Th2 et les basophiles. Ils ont un rôle anti-inflammatoire et favorisent la réparation des tissus, la constitution de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse [114]. Ces macrophages sont associés à la diminution de cytokines pro-inflammatoires et à la baisse de production de radicaux d'oxygène et d'azote. Ils secrètent de fortes concentrations de chimiokines CCL13 (MCP-4), CCL8 (MCP-2), et CCL26 (eotaxine-3), qui régulent le recrutement d'éosinophiles, de basophiles et de cellules polarisées Th2. Ils sont aussi impliqués dans les processus pro-angiogéniques [109] [118]. Ce type de macrophages sécrètent aussi des cytokines telles que

l'IL-1ra et le VEGF et augmente l'expression à sa surface des CMH-II, ainsi que l'expression de récepteurs scavangers tels que le SRA, ou encore le récepteur CD206 [111] [118].

Enfin, les macrophages M2a présentent des concentrations élevées d'arginase-1. Cette enzyme permet le catabolisme de la L-arginine en L-ornithine, un précurseur de polyamines et de la proline qui sont nécessaires à la reconstruction matricielle et à la prolifération cellulaire *(figure 18)* [114] [119].

L'ensemble de ces molécules a pour effet d'augmenter le potentiel phagocytaire du macrophage et de favoriser la cicatrisation tissulaire

III.2.2 M2b

L'activation des macrophages de type M2b nécessite la combinaison de deux signaux.

Parmi ces signaux, on distingue principalement les complexes immuns et l'IL-1β ou le LPS. [114]. Les macrophages M2b sont caractérisés par une forte production d'IL-10 et une faible expression d'IL-12. Ils sont de ce fait impliqués dans la réponse immunitaire de type Th2 [115]. La balance d'expression IL-10 / IL-12 peut être utilisée comme marqueur des macrophages M2b. Bien que cette population de macrophages secrètent une forte concentration d'IL-10, elle secrète aussi des concentrations importantes de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-1β, et l'IL-6 [111]. Toutefois, les macrophages M2b gardent leur effet anti-inflammatoire et participent à la réponse immunitaire de type Th2 et à l'immuno-régulation (*figure 18*).

III.2.3 M2c

La différentiation des macrophages M2c est induite par l'IL-10, le TGFβ ou les glucocorticoïdes. L'IL-10 et le TGFβ sont produits par les macrophages en fin d'inflammation pour limiter la toxicité liée à l'inflammation ce qui induit en conséquence l'activation des macrophages M2c [114].

Ils expriment le récepteur CD163, produisent des concentrations élevées d'IL10 et de TGFβ qui stimulent de manière autocrine les macrophages M2c. Ils présentent une faible expression de facteurs pro-inflammatoires et une forte capacité à éliminer les corps apoptotiques. Ils inhibent l'activité des lymphocytes Th1 et activent les lymphocytes T régulateurs impliqués dans la tolérance immunitaire [111]. Pour ces raisons, ces macrophages sont considérés comme des macrophages régulateurs qui limitent la réaction inflammatoire et interviennent dans la dernière phase du processus inflammatoire en restaurant l'homéostasie tissulaire post-inflammatoire (*figure 18*).

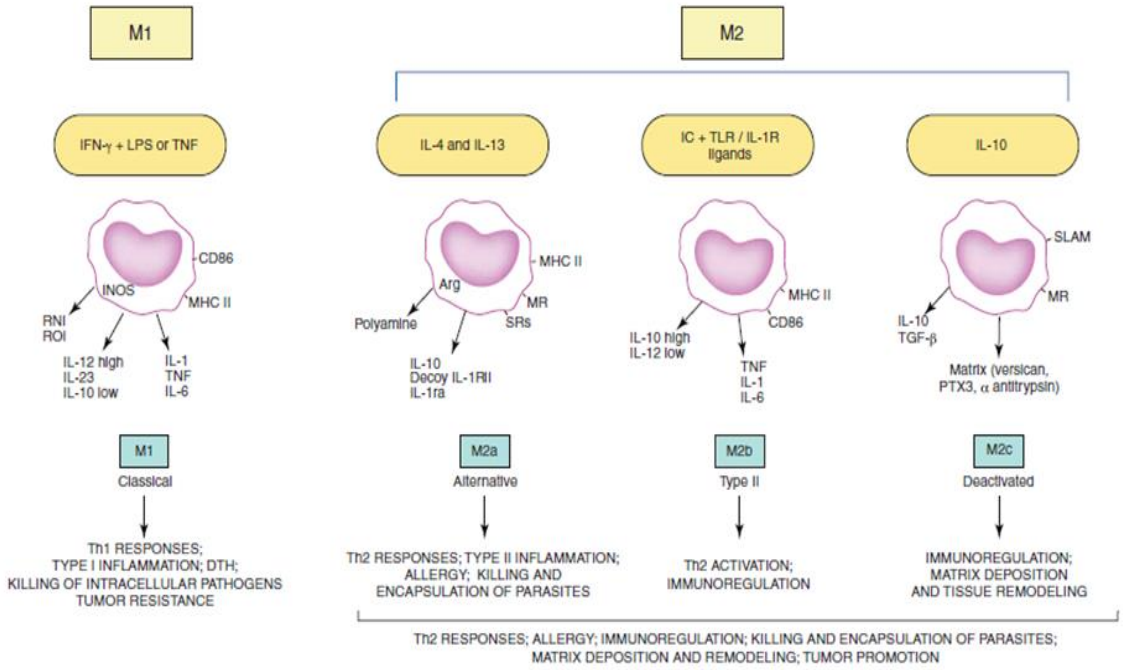


Figure 18. *Caractérisation des différentes populations de macrophages [115]*

IV. Rôle de la polarisation des macrophages dans certaines pathologies

La polarisation des macrophages a fait l'objet de plusieurs études dans différentes pathologies. En effet, un déséquilibre de la balance M1/M2 peut conduire au développement de certaines pathologies infectieuses, inflammatoires, cancers, maladies auto-immunes et métaboliques.

IV.1 Inflammation

Le déséquilibre de la balance M1/M2 peut être à l'origine de plusieurs pathologies autoimmunes et inflammatoires. Dans l'allergie, les concentrations des cytokines et

chimiokines spécifiques de la polarisation M2 sont augmentées [120]. Dans l'asthme, bien qu'il existe une dominance des marqueurs de macrophages M2, plusieurs études s'accordent à montrer que les macrophages M1 sont également impliqués dans cette pathologie. En effet, les concentrations de LPS, d'IFN-γ et de TNF-α sont augmentées dans des échantillons de liquide broncho-alvéolaire de patients asthmatiques ce qui contribuent à l'inflammation des voies aériennes [121] .

Dans le cancer, l'inflammation est majoritairement due au recrutement des monocytes qui vont se différencier en macrophages dans le tissu tumoral. Les macrophages M1 jouent un rôle anti-tumoral et sont impliqués dans l'inhibition de la croissance tumorale via leur action cytotoxique et pro-inflammatoire [121] . La présence des macrophages M1 est notamment corrélée à un meilleur pronostic de survie dans le cancer pulmonaire. La progression tumorale est associée à la présence d'un phénotype particulier de macrophages proche de celui des macrophages M2. Ces macrophages sont appelés TAM (Tumour Associated Macrophages). Les TAM sont fortement présents au sein des tumeurs et font le lien entre inflammation et cancer. Leur présence est corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients. Les TAM secrètent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et produisent de faible quantité de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-6. Les TAM sont de faibles producteurs de NO, de ROI et expriment très faiblement les CMH de classe II, ce qui réduit leur pouvoir cytotoxique, de présentation des antigènes et favorise la progression tumorale. En plus, Ces macrophages possèdent une activité pro-angiogénique importante qui leur permet de favoriser la progression tumorale et les métastases. Les TAM produisent également de la MMP-9 qui dégrade la matrice extracellulaire ce qui facilite la migration des cellules cancéreuses vers la circulation sanguine et ainsi le processus métastatique [120] [121].

IV.2 La pemphigoïde bulleuse

L'étude de la polarisation des macrophages dans la pemphigoïde bulleuse est très récente. En effet, en 2014 une première étude a mis en évidence la présence des macrophages M2 dans la PB et dans le pemphigus vulgaris, en analysant essentiellement l'expression des deux récepteurs CD206 et CD163. Cette étude a conclu à une présence des marqueurs M2 dans les échantillons de patients atteints de PB plus importante que chez les patients atteints de pemphigus vulgaris [122]. Toutefois la polarisation des macrophages ans la PB pourrait présenter de multiples facettes. En effet, nous avons montré très récemment la présence d'IL-23 dans des échantillons de PB [64] ,suggérant une potentielle polarisation vers le type M1 dans la PB. En revanche, la PB est une maladie autoimmune, et la présence de complexes immuns argumente plutôt en

faveur d'une polarisation de type M2b. Enfin le traitement par les corticoïdes pourrait aussi influencer l'orientation de ces cellules vers une polarisation de type M2c.

OBJECTIF DU TRAVAIL

La pemphigoïde bulleuse (PB) est une dermatose bulleuse sous-épidermique à déclenchement auto-immun comprenant l'apparition d'auto-anticorps contre PB180 et PB230, puis la fixation de ceux-ci sur leurs sites antigéniques de l'hémidesmosome. L'étude de la physiopathologie de la maladie a montré l'implication de cytokines dans une suite d'étapes inflammatoires, incluant le recrutement et la dégranulation de cellules inflammatoires, avec la libération de protéases (MMP9, HLE) comme effecteurs terminaux du clivage dermo-épidermique. De plus, d'autres études ont montré que les kératinocytes sont les principaux effecteurs de la réponse immune in situ dans la PB [123]. Ces cellules peuvent sous l'effet de l'IL-17 secréter la chimiokine CXCL10 [124]. En outre, la présence de cette chimiokine a aussi été montré dans les sérums de patients atteints de PB [65].

En se basant sur ces données, nous avons formulé l'hypothèse que la chimiokine CXCL10 agirait comme un acteur de la réaction inflammatoire, notamment en recrutant et activant des cellules inflammatoires / immunes, favorisant ainsi la pérennisation de la réaction inflammatoire cellulaire *via* l'induction de protéases. **Le premier objectif** de mon projet de thèse était donc de mieux caractériser et comprendre cette réaction inflammatoire chez les sujets âgés atteints de PB en étudiant l'expression de cette chimiokine proinflammatoire CXCL10 dans le sérum des patients PB et au niveau du site de lésion de la peau, et d'analyser ses effets sur l'expression de la protéase MMP-9 par les cellules de l'immunité**. *(Publication n°1)***

Les résultats de cette première étude illustraient un rôle important de la population monocytaire sous l'effet de CXCL10 dans la réaction inflammatoire associée à la PB. Toutefois ces monocytes se différencient en macrophages lors de leur migration dans les tissus. Plusieurs études ont montré un rôle important de la polarisation des macrophages (sous types M1, M2a, M2b et M2C) dans les maladies autoimmunes [121], et dans les processus inflammatoires [125]. Etant donné que CXCL10 est un marqueur du sous type M1[115], nous avons formulé l'hypothèse que la polarisation des macrophages peuvent jouer un rôle dans la cascade inflammatoire observée dans la PB. **Notre deuxième objectif** était donc de caractériser les macrophages présents dans la PB *via* l'expression de CXCL10 et de 2 marqueurs des macrophages de type 2 que sont CD163 et CD206. Nous avons ensuite étudié l'association éventuelle avec l'expression de la MMP-9 dans ces macrophages. Dans ce but, nous avons utilisé deux modèles de polarisation des macrophages. D'une part un premier modèle de polarisation des macrophages issus de la lignée monocytaire THP-1 utilisé pour dresser un

tableau préliminaire de l'expression des différents marqueurs de polarisation en présence du sérum ou du LB, et dans un deuxième temps, un modèle de différentiation de macrophages à partir de monocytes humains issus de malades PB ou de sujets CTL pour essayer de mimer l'environnement physiopathologique de la maladie. ***(Publication n°2)***

RESULTATS

A. Rôle de la chimiokine CXCL10 dans la réponse inflammatoire associée à la PB

1. Synthèse

Contexte de l'étude :

Notre équipe Derm-I-C, au sein de l'EA7319 de l'Université Reims Champagne Ardenne qui est en étroite collaboration avec le centre de références des maladies bulleuses auto-immunes (Service de dermatologie- CHU Reims), s'intéresse à l'étude de la maladie de la PB. Cette maladie est la plus fréquente des maladies bulleuses sous-épidermiques auto-immunes se développant sur une base inflammatoire et touche essentiellement la personne âgée. Bien que la majorité des patients sont rapidement contrôlés sous forte corticothérapie, environ 30% des patients rechutent au cours de la première année.

Notre équipe a récemment montré que les concentrations de plusieurs cytokines appartenant à l'axe IL-17 variaient de manière différente chez les patients PB en rémission ou à risque de rechute durant la première année de traitement [63]. Ceci suggère que l'utilisation de certains paramètres immunologiques peut être utile du point de vue clinique pour prévoir le risque de rechute. En outre, il a été montré que CXCL10,molécule chimioattractante pour plusieurs cellules inflammatoires, était exprimée dans le sérum de patients PB et que sa concentration était associée à la sévérité de la maladie [65]. De point de vue mécanisme, l'étude de modèles animaux a montré que l'apparition de la bulle dans la maladie dépendait de la libération de protéases dont la MMP-9 et l'élastase comme effecteurs terminaux. Nous avons donc émis l'hypothèse que CXCL10 pourrait jouer un rôle direct dans l'évolution de la maladie en amplifiant la réponse immunitaire via l'induction de la MM-9.

Objectifs de l'étude :

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si CXCL10 pouvait être utilisé comme marqueur de rechute chez les patients PB. et de voir son rôle dans la cascade inflammatoire associée à la PB , en étudiant son effet sur la MMP-9 et finalement nous avons cherché à étudier l'effet du méthylprénisolone et du composé A, un activateur sélectif des récepteurs aux glucocorticoïdes, sur la régulation des effets de CXCL10 sur l'expression de la MMP-9, afin de trouver une nouvelle alternative aux traitement actuel de la PB.

Matériel et Méthodes

Des biopsies de peau (n=16) , des sérums (n=114), des liquides de bulles (n=23) de patients , ainsi que des cellules inflammatoires primaire isolées à partir de sang total de patients, ont été utilisés pour étudier l'expression et le rôle de CXCL10 dans la physiopathologie de la réponse inflammatoire associée à la PB.

Résultats

Au niveau du site de lésion de la peau des patients atteints de PB, CXCL10 est fortement exprimée par des cellules résidentes comme les kératinocytes et les fibroblastes, ainsi que par les cellules immunitaires infiltrées. Les concentrations de CXCL10 mesurées par ELISA étaient plus élevées dans les liquides de bulles et dans les sérums de patients en comparaison avec des sérums de sujets sains appariés en âge et en sexe. De plus, les concentrations de CXCL10 dans le sérum augmentaient après 60jours de traitement, et ce uniquement chez les patients qui rechutent au cours de la première année de traitement. L'expression de CXCL10 pouvait être augmentée par elle-même et aussi par la cytokine IL-17. Seuls les neutrophiles et les monocytes isolés de patients atteints de PB, mais pas leurs lymphocytes, répondaient à une stimulation par CXCL10 par une augmentation de leur sécrétion en MMP-9 *via* l'activation des voies de signalisation ERK1/2, P38 et PI3K. Finalement, la sécrétion de la MMP-9 induite par CXCL10 était inhibée par le méthylprednisolone et par le composé A, un ligand non stéroïdien pour les récepteurs aux glucocorticoïdes.

Conclusion

Nos travaux montrent que CXCL10 pourrait être considéré comme marqueur d'évolution de la maladie, puisque sa concentration reste élevée sous traitement chez les patients qui rechutent. Nos résultats ont également apporté de nouvelles données sur le rôle des neutrophiles et surtout les monocytes dans le processus physiopathologique de la maladie puisqu'elles sont les seules cellules sensibles à l'effet de CXCL10 pour augmenter la MMP-9. Enfin, nous avons montré l'importance des activateurs sélectifs des récepteurs des glucocorticoïdes, tels que le composé A, qui pourrait être un traitement alternatif qui peut réduire les effets secondaires et les problèmes de résistance liés aux traitements actuels par les glucocorticoïdes.

2. Publication n°1

Bullous pemphigoid outcome is associated with CXCL10-induced MMP-9 secretion from monocytes and neutrophils but not lymphocytes

Meriem Riani, Sebastien Le Jan, Julie Plee, Anne Durlach, Richard Le Naour, Guy Haegeman, Philippe Bernard, and Frank Antonicelli.

(Accepté pour publication dans the Journal of allergy and clinical immunology, Août 2016)

ARTICLE IN PRESS

Bullous pemphigoid outcome is associated with CXCL10-induced matrix metalloproteinase 9 secretion from monocytes and neutrophils but not lymphocytes

Meriem Riani, MSc,[a] Sébastien Le Jan, PhD,[a] Julie Plée, MD,[a,b] Anne Durlach, MD, PhD,[c] Richard Le Naour, PhD,[d] Guy Haegeman, PhD,[e] Philippe Bernard, MD, PhD,[a,b]* and Frank Antonicelli, PhD[a,b]* *Reims, France, and Ghent, Belgium*

Background: The outcome of bullous pemphigoid (BP), the most frequent autoimmune skin-blistering disease, involves matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), IL-17, and IL-23 release from infiltrated inflammatory cells. The chemokine CXCL10 has been associated with several autoimmune diseases, but its participation in BP pathophysiology still needs to be clarified.
Objective: We sought to assess whether BP outcome was associated with different CXCL10 levels and to evaluate the contribution of CXCL10 to the described cytokine/protease inflammatory loop associated with disease outcome.
Methods: Skin biopsy specimens (n = 16), serum (n = 114), blister fluid (n = 23), and primary inflammatory cells from patients with BP were used to investigate CXCL10 expression and function.
Results: At baseline, both resident cells, such as keratinocytes and fibroblasts, and infiltrating immune cells expressed CXCL10 at lesional sites in skin of patients with BP. CXCL10 levels were higher in blister fluid ($P < .0001$) and serum ($P < .005$) from patients with BP than in serum from age- and sex-matched control subjects (n = 34). Furthermore, CXCL10 serum levels increased at day 60 only in patients who relapsed within the first year of treatment (n = 33, $P < .005$). Interestingly, *CXCL10* expression could be upregulated by itself and IL-17 in inflammatory cells. Notably, neutrophils and monocytes from patients with BP, but not lymphocytes, responded to CXCL10 by increasing MMP-9 secretion through the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38, phosphoinositide-3 kinase signaling pathways. Finally, CXCL10-increased MMP-9 secretion was inhibited by methylprednisolone and also by compound A, a novel nonsteroidal glucocorticoid receptor ligand.
Conclusion: We showed that increased levels of inflammatory biomarkers in patients with BP, such as CXCL10, favor neutrophil- and monocyte-associated MMP-9 release and disease relapse and opened new therapeutic horizons in patients with this autoimmune disease. (J Allergy Clin Immunol 2016;■■■:■■■-■■■.)

Key words: *Bullous pemphigoid, autoimmunity, inflammation, CXCL10, selective glucocorticoid receptor activator, compound A*

Bullous pemphigoid (BP) is the most common autoimmune subepidermal blistering disease. The disease typically occurs in the elderly, with a generalized pruritic bullous eruption. Although most cases of BP are rapidly controlled by therapy, approximately 30% of patients experience disease relapse within the first year of follow-up.[1] Recently, a panel of experts elaborated recommendations to evaluate disease activity at the time of diagnosis and therapeutic response.[2] However, there is currently no tool available to predict disease outcome.

BP is associated with BP180/BP230 autoantibody production. After a few weeks of treatment with either systemic or super-potent topical corticosteroids, patients with BP are cleared of all clinical symptoms or signs while anti-BP180 autoantibody serum levels are still high.[1,3,4] Recently, we showed that not only serum autoantibody titers but also the serum concentration of cytokines belonging to the IL-17 axis varied differently in patients with BP with ongoing remission or in patients with BP who relapsed during the first year of treatment,[1,5,6] suggesting that immunologic and biological parameters could help clinicians predict BP relapse. Here, we aimed at further extending this notion, with the ultimate goal to later elaborate a useful and practical score associated with disease outcome.

BP flares are associated with skin alterations induced by the binding of autoantibodies to proteins of the hemidesmosome, which further triggers the inflammatory pathophysiologic process leading to dermal-epidermal junction cleavage and, subsequently, to blister formation. The role of inflammatory cells and molecules in this process has been largely demonstrated with the use of animal models.[7-9] In addition, the importance of the inflammatory response in patients with BP was further evidenced by the presence of large amounts of cytokines in serum and blister fluid from patients with BP.[10] Release of cytokines at skin lesional sites requires both recruitment and activation of inflammatory cells. In this line CXCL10, a chemoattractant molecule for several inflammatory cells,[11] was shown to be expressed in serum from patients with BP.[12] Interestingly, CXCL10 levels in the serum of patients

From [a]the Laboratory of Dermatology, EA7319 Derm-I-C, [b]the Department of Dermatology, University Hospital, and [d]Laboratory IMAB, EA4683, University of Reims-Champagne-Ardenne, Reims; [c]Laboratory Pol Bouin, Hospital Maison Blanche, University Hospital, Reims; and [e]LEGEST-University Gent, Ghent.

*These authors contributed equally to this work as senior authors.

Supported by research grants from the Contrat Plan Etat Région (CPER) 2008, the MAISAGE-PB project supported by the regional council, and the French Department of Health's "Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) Interrégional" 2009. S.L.J. was supported by grants from the Centre de Référence Maladies Rares "Maladies bulleuses auto-immunes" at the University Hospital of Reims.

Disclosure of potential conflict of interest: M. Riani has received grants from the Champagne Ardenne Councyl. P. Bernard has received grants from regional (north east of France) PHRC 2012. F. Antonicelli has received grants from the Champagne Ardenne Councyl. The rest of the authors declare that they have no conflict of interest.

Received for publication January 20, 2016; revised June 24, 2016; accepted for publication August 8, 2016.

Corresponding author: Frank Antonicelli, PhD, Laboratory of Dermatology, EA-7319 Derm-I-C, University of Reims-Champagne-Ardenne, Reims, 51 rue Cognacq Jay, 51095 Reims Cedex, France. E-mail: frank.antonicelli@univ-reims.fr.

0091-6749/$36.00

© 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.012

Abbreviations used
BF: Blister fluid
BP: Bullous pemphigoid
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
MMP-9: Matrix metalloproteinase 9
NF-κB: Nuclear factor κB
PI3K: Phosphoinositide-3 kinase

with BP significantly increased with disease severity,[12] which is in line with the fact that high CXCL10 levels in the peripheral fluid are considered a marker of host immune response in both patients with organ-specific and those with systemic autoimmune diseases.[11,13,14] Therefore serum CXCL10 expression might be of importance because it could reflect important production of this potent chemoattractant for inflammatory cells at the site of the lesion. In addition to its chemotactic effects, CXCL10, which is expressed not only by inflammatory immune cells, such as lymphocytes, monocytes, and neutrophils, but also by resident cell types involved in skin architecture, such as keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells,[11,13,14] has several other functions through activation of its receptor, CXCR3, which could either expand an autoaggressive immune response or facilitate tissue regeneration.[15,16] However, the implications of CXCL10 in the pathophysiologic process of BP and as a potential marker of BP relapse have not been investigated.

Subepidermal blister formation depends on proteinases released by infiltrating inflammatory cells.[17-20] Within BP blister fluids, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and neutrophil elastase are key proteinases in the pathologic process associated with BP, although other proteinases are also involved in the proteolytic cascade.[5,18,21-27] In addition, MMP-9 is also a key molecule involved in the infiltration of inflammatory cells.[28] Although the binding of CXCL10 onto its receptors, CXCR3A and CXCR3B, regulates immune responses through the recruitment and activation of leukocytes, such as lymphocytes, eosinophils, monocytes, and neutrophils, the main infiltrated cells observed in the lesional skin of patients with BP,[29-31] its involvement in MMP-9 secretion from these cells has still not been investigated.

In the present study we investigated CXCL10 expression at the site of lesions and in biological fluids (serum and blister fluid) in patients with BP and assessed CXCL10 clinical involvement by performing a longitudinal study of serum CXCL10 concentrations with respect to outcome in patients with BP. The link between the presence of CXCL10 and other inflammatory molecules (particularly IL-17) was further examined in serum according to outcomes in patients with BP. Finally, we investigated the influence of CXCL10 in the protease-mediated autoinflammatory response associated with BP and initiated a novel strategy to potentially control this response by using a new nonsteroidal potential therapeutic agent mimicking corticosteroids.

METHODS

Study patients and design

This prospective, multicenter, observational, and translational study was conducted in 8 French Dermatology departments, among which 3 belong to the French Referral Center for Autoimmune Bullous Diseases (Reims, Rouen, and Limoges). Consecutive patients with newly diagnosed BP were included based on the following criteria: clinical features typical of BP with the presence of at least 3 of 4 well-established criteria by Vaillant et al,[32] subepidermal blistering on skin biopsy, and deposits of IgG, C3, or both in a linear pattern along the epidermal basement membrane zone determined by means of direct immunofluorescence. Among the 122 patients with BP included, 31 consecutive patients with BP were enrolled in the Dermatology Department of the Reims University Hospital from 2009 to 2011 (8 men and 23 women; mean age, 80.8 years; range, 53-96 years). For these patients, blister fluid was collected at the time of diagnosis, when possible. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Reims (institutional review board; 04/14/2009); patients or their relatives received an information letter and provided oral consent. Serum samples from age- and sex-matched patients without inflammatory and autoimmune diseases admitted to the trauma department of the Reims University Hospital were used as control subjects. All voluntary subjects provided written informed consent before inclusion in the study.

Cell isolation and cell culture

The THP-1 monocytic cell line, kindly provided by Dr S. Hart from the University of Edinburgh, United Kingdom, was cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS, 2 mmol/L glutamine, 25 U/mL penicillin, and 25 U/mL streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. PBMCs and PMN cells from control subjects or patients with BP were obtained by means of density gradient centrifugation from EDTA-treated whole blood by using a density gradient medium (GranuloSep; Eurobio-Abcys, Courtaboeuf, France). Monocytes were purified from PBMCs by means of positive selection with CD14 immunomagnetic beads (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer's instructions. Flow through was then used to isolate T lymphocytes by means of negative selection with the Pan T-cell Isolation Kit from Miltenyi Biotec (MACS). All leukocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies), 2 mmol/L glutamine, 25 U/mL penicillin, and 25 U/mL streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. Monocytes were differentiated into macrophages by culturing them for 7 days in the presence of autologous serum (10%).

Freshly isolated lymphocytes and monocytes from patients with BP and monocyte-derived macrophages from patients with BP were stimulated for 3 hours with IL-17, IL-23, or CXCL10 (1 ng/mL). Cells were then harvested, and *CXCL10* gene expression was analyzed. For MMP-9 expression analysis, isolated leukocytes from healthy donors and patients with BP and THP-1 cells were cultured in FBS-free medium and stimulated overnight (PBMCs, lymphocytes, and monocytes) or for 1 hour (PMNs) with CXCL10 (500 pg/mL). Cells and culture media were harvested and analyzed for gene expression and signaling pathway activation and MMP-9 secretion respectively. When indicated, the pharmacologic inhibitors U0126 (Promega, Madison, Wis), LY294002, and SN50 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and SB203580 (Sigma, St Louis, Mo), methylprednisolone (Sigma), and compound A[33] were introduced 1 hour before stimulation. All experiments were performed at least 3 times. To mimic *in vivo* conditions, freshly isolated PBMCs from healthy subjects were cultured in RPMI medium at a concentration of 2×10^6 cells/mL with 25% blister fluid (BF) for 24 hours consecutively to a stimulation with either 25% autologous serum or 25% serum from patients with BP for 24 hours before harvest for *CXCL10* gene expression analysis (n = 5). Control PBMCs were cultured at a concentration of 2×10^6 cells/mL with either 25% autologous serum or BP serum alone.

Gene expression analysis

Total RNA from isolated and cultured cells was extracted with TRI Reagent (Euromedex, Bas-Rhin, France). Reverse transcription was performed from 1 μg of total RNA by using the Maxima First Strand cDNA kit with dsDNAse (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. *CXCL10*, *MMP9*, *CXCR3A*, and *CXCR3B* gene expression was analyzed by using real-time PCR with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif) on the LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Relative quantification was performed with β_2-microglobulin as a reference gene.

ARTICLE IN PRESS
J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME ■■■, NUMBER ■■

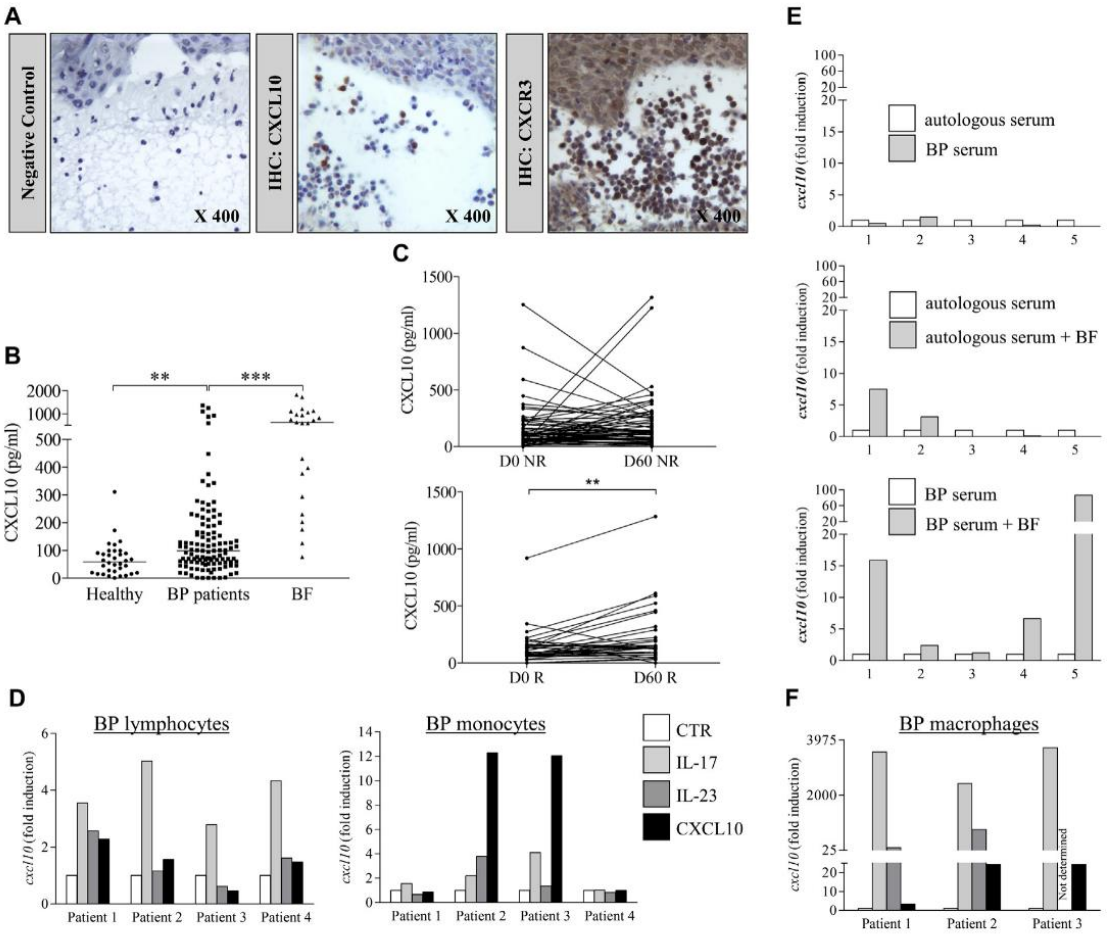


FIG 1. CXCL10 expression at skin lesional sites and in biological fluids of patients with BP. **A,** CXCL10 and CXCR3 immunohistochemistry on skin biopsy specimens of patients with BP. **B,** CXCL10 concentrations in serum of healthy subjects, serum of patients with BP, and blister fluid *(BF)* of patients with BP at baseline. **C,** Serum variations of CXCL10 concentrations between days 0 and 60 in patients with *(R)* and without *(NR)* relapse. **D-F,** *CXCL10* gene expression in cytokine-stimulated lymphocytes and monocytes from patients with BP (Fig 1, *D*), serum- and BF-induced PBMCs from, healthy subjects (Fig 1, *E*), and cytokine-stimulated BP monocyte-derived macrophages (Fig 1, *F*). $^{**}P < .01$ and $^{***}P < .001$.

CXCL10 expression in patients with BP

CXCL10 expression was analyzed *in situ* by means of immunohistochemistry and in biological fluids by using ELISA. Detailed procedures for analysis with immunohistochemistry and ELISA are described in the Methods section in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

Zymography

MMP-9 levels were determined on conditioned media by using the zymography technique. Briefly, samples were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel impregnated with 0.1% gelatin as substrate under nonreducing conditions.[34] The gels were subsequently fixed and stained with 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 to visualize the proteolytic activity bands. Quantification was performed with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Md).

Western blot and signaling assays

Nuclear and cytoplasmic extracts from CXCL10-stimulated THP-1 cells were prepared, as described by Antonicelli et al.[35] Both were separated on SDS polyacrylamide gel and transferred to a Hybond-ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare Biosciences, Fairfield, Conn). Membranes were incubated with the following primary antibodies: rabbit anti–nuclear factor κB (NF-κB) p50 (H-119), mouse anti–NF-κB p65 (F-6), rabbit anti–phospho-p38, goat anti–lamin B (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex), anti–α-tubulin (Merck Millipore), rabbit anti–phospho-AKT, rabbit anti–phospho–extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, rabbit anti-AKT, and rabbit anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Danvers, Mass). Immunoreactivity was visualized by means of enhanced chemiluminescence (ECL or ECL Plus Western Blotting System, GE Healthcare Biosciences).

Statistical analysis

Descriptive statistics, such as means, SDs, or SEMs were conducted for all quantitative measures. Because the distribution of the CXCL10 concentration in serum and BF could not be assumed to be normal in this study, we used nonparametric testing to compare populations (Mann-Whitney and Wilcoxon tests). Two-way ANOVA was used to analyze the effect of CXCL10 treatment on MMP-9 activity in PMNs, PBMCs, monocytes, and lymphocytes isolated

TABLE I. CXCL10 and CXCR3 expression patterns were analyzed by means of immunohistochemistry in skin biopsy specimens from patients with BP

	CXCL10 expression pattern				CXCR3 expression pattern			
		Skin-resident cells				Skin-resident cells		
	Inflammatory cells	Keratinocytes	Vascular cells	Fibroblasts	Inflammatory cells	Keratinocytes	Vascular cells	Fibroblasts
Skin biopsy specimens from patients with BP								
1	+++	++	+	−	+++	+++	++	++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	+/−	+/−	+/−	−	+	+	−	−
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	−	+/−	+/−	−				
6	+	++	++	−	+++	++	++	+
7	+/−	++	+++	++	++	++	+++	++
8	++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++
9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	−	+/−	+/−	−	++	+/−	+	−
11	++	+	++	+	+++	++	++	+
12	+	+	++	−	+	++	+++	+++
13	−	−	+/−	−	−	+/−	+	−
14	−	−	−	−	+	−	−	−
15	−	−	−	−	+	+/−	−	−
16	−	−	−	−	−	+/−	−	−

+++, Very highly expressed; ++, highly expressed; +, expressed; +/−, poorly expressed; −, not expressed.

TABLE II. Serum levels of CXCL10 (in picograms per milliliter) at the time of diagnosis according to disease extent and outcome

BP extent at time of diagnosis*			BP outcome (first year)		
Moderate	Severe	*P* value	Remission	Relapse	*P* value
164 ± 30 (n = 65)	158 ± 30 (n = 49)	.76	172 ± 28 (n = 80)	137 ± 27 (n = 34)	.63

*Extensive BP was defined as the occurrence of at least 10 new blisters daily.[16]

from control subjects or patients with BP. The results were considered significant if *P* values were .05 or less.

RESULTS

CXCL10 was highly expressed in blister fluid of patients with BP

Immunohistochemistry experiments on 16 skin biopsy specimens from patients with BP showed expression of CXCL10 by infiltrated cells, which were located both at the dermal-epidermal junction and in blister fluid (Fig 1, *A*). Concomitant to CXCL10 expression, infiltrating cells within the lesional skin also expressed the CXCL10 receptor CXCR3 (Fig 1, *A*). CXCL10 and CXCR3, which were detected in most of the biopsy specimens (Table I), were also expressed by skin-resident cells, such as keratinocytes and fibroblasts (Table I and see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). CXCL10 and CXCR3 expressions by inflammatory cells were concomitant to those observed in resident cells (Table I). Using a specific ELISA test, higher concentrations of CXCL10 were measured in blister fluid (711 ± 100 pg/mL, n = 23) compared with serum (162 ± 21 pg/mL, n = 114) from patients with BP ($P < .0001$; Fig 1, *B*), which were themselves even higher than CXCL10 concentrations in serum from age- and sex-matched control subjects (67 ± 10 pg/mL; $P = .004$, n = 34). At baseline, CXCL10 concentrations varied according to neither disease extent nor disease outcome (Table II).[16]

On the basis of our previous studies on BP autoantibodies[1] and IL-17 and IL-23 cytokines[6] during patient follow-up, we investigated the relevance of measuring variations in CXCL10 concentrations in the serum of patients with BP at days 0 and 60 for patients for whom serum samples were available (n = 96). The clinical characteristics of this subgroup of patients with BP were similar to those of the whole studied population in terms of sex ratio, mean age, percentage of patients with extensive versus moderate disease, and rate of BP relapse within the first year of treatment (data not shown). Although BP was clinically controlled in all patients, the serum concentration of CXCL10 significantly increased between days 0 and 60 (n = 33; 139 ± 27 vs 221 ± 43 pg/mL; $P = .003$) in the population of patients with BP who relapsed within the first year of treatment, whereas such variation did not occur in the population of patients with BP in remission (Fig 1, *C*). Using blood cells from patients with BP, we showed that IL-17 increased *CXCL10* mRNA expression from lymphocytes and that CXCL10 itself could increase its own expression in monocytes (2 of 4 patients with BP; Fig 1, *D*). Accordingly, at the time of diagnosis and after 2 months of treatment, nearly all patients expressing IL-17 also expressed CXCL10 in their serum, and this occurred whatever the outcome of the disease (Fig 2).

To determine whether leukocytes required to be preactivated within the serum to later produce CXCL10 at sites of cutaneous lesions, we used our BP-related transdifferentiation cell model from blood to lesional skin.[5] To that end, PBMCs were isolated from healthy subjects (n = 5) incubated consecutively with serum (BP vs autologous) for 48 hours and with blister fluid from patients with BP for an additional 48 hours (Fig 1, *E*). Cells stimulated with serum from patients with BP or autologous serum

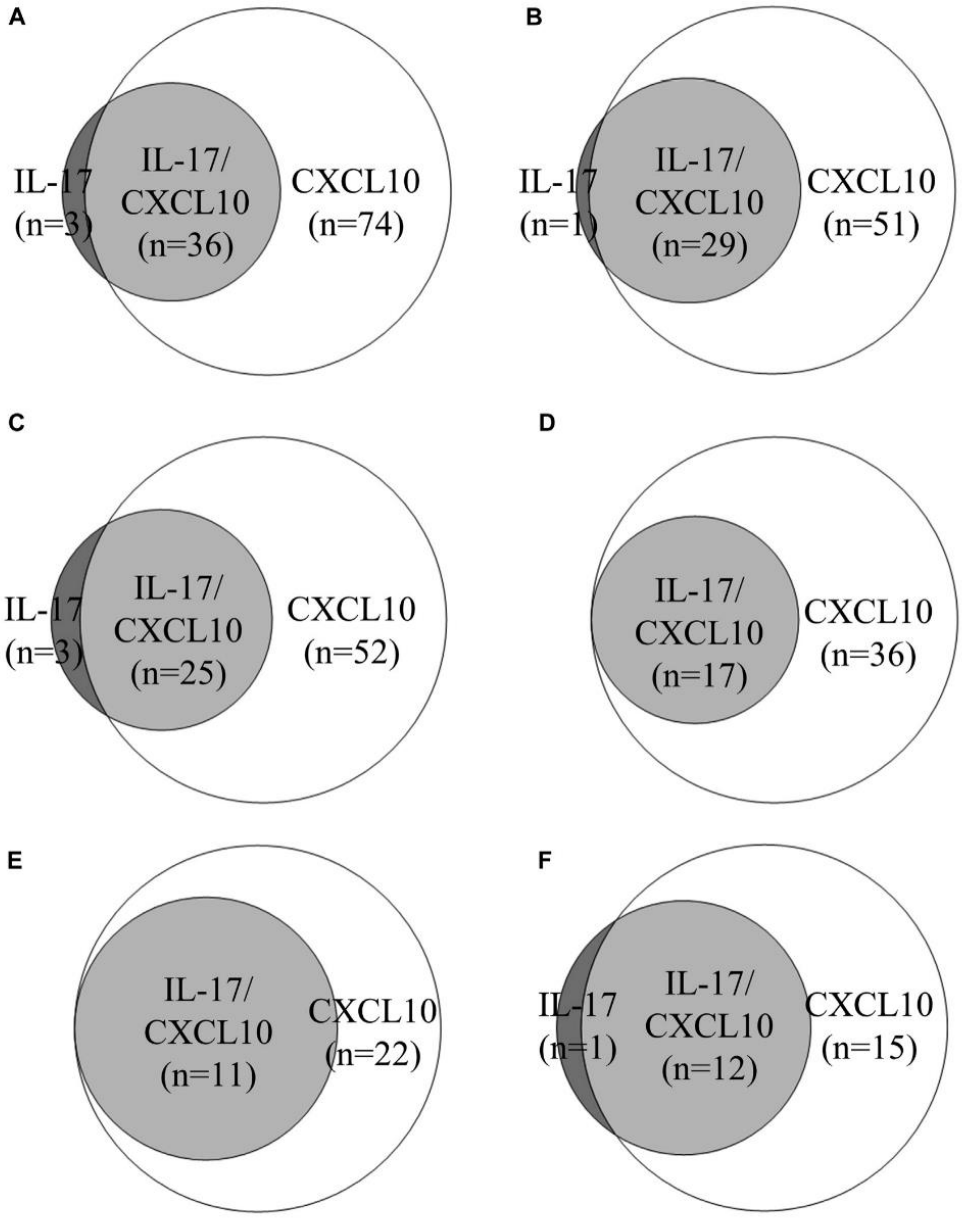


FIG 2. Distribution of IL-17 and CXCL10 expression in populations with BP. Venn diagram showing the number of patients expressing IL-17 and CXCL10 at diagnosis and after 2 months of treatment, respectively, in the global population with BP (**A** and **B**), patients with BP in remission (**C** and **D**), and those who experienced further relapsed (**E** and **F**).

alone did not show any significant variation in *CXCL10* expression (Fig 1, *E*, higher panel). When blister fluid was consecutively added to cells initially stimulated with autologous serum, the increase in *CXCL10* expression was not consistent (Fig 1, *E*, middle panel). In contrast, consecutive PBMC stimulation with serum and blister fluid from patients with BP induced a substantial increase in *CXCL10* expression in nearly all cases (Fig 1, *E*, lower panel). Indeed, consecutive stimulation of autologous or BP serum–treated PBMCs by blister fluid from patients with BP induced *CXCL10* expression by 3.5 ± 2.6 and 22.6 ± 16.3, respectively (mean ± SEM). In this line monocyte-derived macrophages upon serum stimulation expressed higher *CXCL10* levels when stimulated with IL-17 (Fig 1, *F*). The effects of IL-23 and CXCL10 itself on *CXCL10* expression were patient dependent (Fig 1, *F*). Together, these results suggested that systemic inflammation increases CXCL10 production from

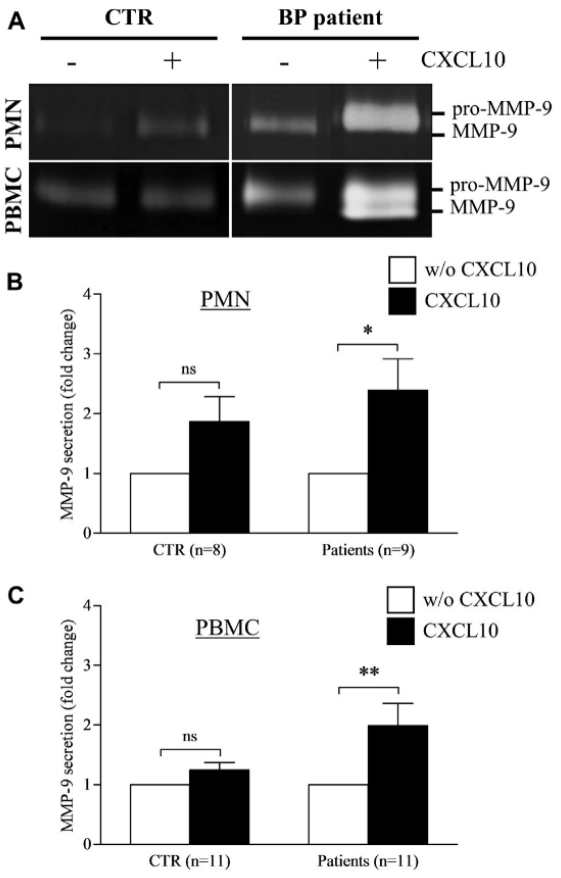


FIG 3. MMP-9 secretion upon CXCL10 stimulation of inflammatory cells. **A,** MMP-9 activity measured by means of zymography in PMN cells and PBMCs from healthy control subjects or patients with BP and stimulated with CXCL10. **B** and **C,** Quantification of MMP-9 activity in PMN cells (Fig 3, *B*) and PBMCs (Fig 3, *C*). *Error bars* denote means ± SEMs, and 2-way ANOVA was used for statistics. **P* < .05 and ***P* < .01. *ns,* Not significant.

circulating cells and induces a preactivation state in those circulating leukocytes that favors their responses to cytokines/chemokines from blister fluid to produce CXCL10 *in situ*.

CXCL10 induced MMP-9 expression from monocytes and neutrophils

We then wondered whether CXCL10 could increase MMP-9 expression from both PBMCs and PMN cells originating from either healthy subjects or patients with BP. CXCL10 (500 pg/mL) significantly increased MMP-9 secretion from both PBMCs and PMN cells isolated from patients with BP but not from healthy control subjects (Fig 3), confirming the prerequisite of a preactivation step for leukocytes in patients with BP to later respond to proinflammatory stimuli. In addition, CXCL10 increased MMP-9 secretion under both the zymogen and active forms in PBMCs from patients with BP, as demonstrated on gel zymography (Fig 3, *A*).

We then investigated whether both lymphocytes and monocytes could secrete MMP-9 in response to CXCL10. Lymphocytes or monocytes purified from both patients with BP and healthy donors were stimulated similarly to PBMCs with CXCL10 at a concentration of 500 pg/mL. As shown in Fig 4, only monocytes from patients with BP displayed a significantly increased secretion of activated MMP-9 upon CXCL10 stimulation (n = 7). This effect was associated with an increased *MMP9* mRNA level when analyzed in 4 consecutive patients with BP (Fig 4, *D*).

CXCR3 expression was not the limiting factor controlling CXCL10-induced MMP-9 production

We then wondered whether the differential MMP-9 expression observed between control subjects and patients with BP, as well as between lymphocytes and monocytes, could be related to the level of CXCL10 receptor expression (Fig 5). Analysis of both *CXCR3A* and *CXCR3B* mRNA expression did not reveal any significant variations between control subjects and patients with BP in either lymphocytes or monocytes. However, the ratio of the 2 CXCR3 isoforms appeared to be inversed between lymphocytes and monocytes both in patients with BP and control subjects. *CXCR3B* mRNA was similarly expressed in lymphocytes and monocytes, whereas *CXCR3A* mRNA was significantly more expressed in lymphocytes than monocytes ($P = .0015$). The overexpression of either CXCR3A or CXCR3B was performed in the monocyte-derived cell line THP-1 to further investigate the role of these receptors in MMP-9 expression upon CXCL10 stimulation (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Overexpression of each CXCR3 isoform increased MMP-9 secretion in response to CXCL10.

To further investigate the mechanisms associated with MMP-9 expression upon CXCL10 stimulation, we investigated several signaling pathways connected to CXCR3A and CXCR3B activation (Fig 6). Kinetics analysis of untransfected THP-1 cells revealed that all signaling cascades investigated (ERK1/2, p38, phosphoinositide-3 kinase [PI3K]/AKT, and NF-κB) were activated after CXCL10 stimulation, although to different degrees (Fig 6, *A*). Signaling pathway activation was observed either through protein phosphorylation (ERK1/2, p38, and PI3K/AKT) or protein translocation from cytoplasm to nucleus (NF-κB). Nonphosphorylated forms, α-tubulin and lamin B, were used as loading controls. CXCL10 increased AKT phosphorylation after 1 hour and ERK1/2 and p38 phosphorylation after 4 hours of cell stimulation. CXCL10 also induced partly but time dependently the translocation of the p65 subunit of NF-κB from the cytosolic to the nuclear fraction, therefore increasing the proportion of the nuclear active p50/p65 heterodimer of this transcription factor, although most of these subunits remained inactive in the cytoplasm. The use of specific inhibitors for these signaling pathways showed the prevailing role of the ERK1/2 (U016), p38 (SB203580), and PI3K/AKT (LY294002) signaling pathways over NF-κB (SN50) in the upregulation of MMP-9 in monocytes (Fig 6, *B*). Meanwhile, p38 and PI3K/AKT, but neither ERK1/2 nor NF-κB, signaling pathways were involved in MMP-9 production from CXCL10-stimulated PMN cells isolated from patients with BP (Fig 6, *B*). The use of methylprednisolone and a novel glucocorticoid receptor ligand (compound A) dose-dependently inhibited CXCL10-induced MMP-9 secretion from the monocytic cell line (Fig 6, *C*).

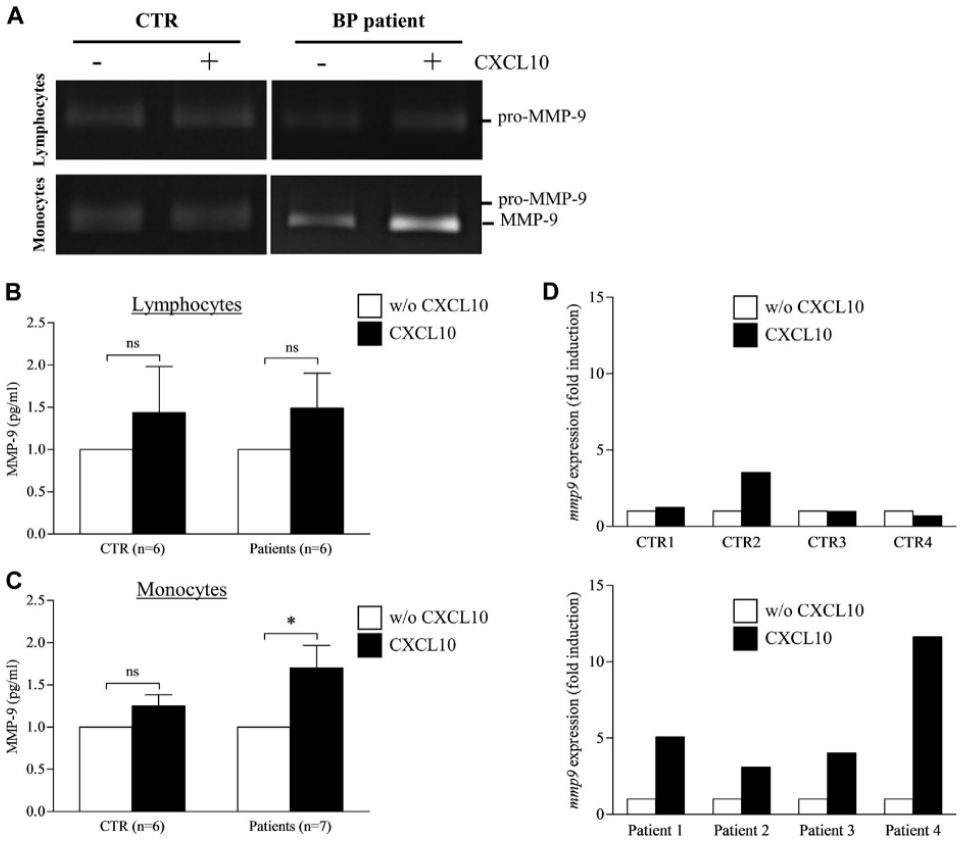


FIG 4. CXCL10 selectively induced MMP-9 expression in monocytes from patients with BP. **A,** Gel zymography of MMP-9 activity in lymphocytes and monocytes from healthy control subjects and patients with BP upon CXCL10 stimulation. **B** and **C,** Quantification of MMP-9 activity in lymphocytes (Fig 4, *B*) and monocytes (Fig 4, *C*). **D,** CXCL10-induced *MMP9* mRNA expression in monocytes from healthy control subjects and patients with BP. **P* < .05. *ns,* Not significant.

DISCUSSION

Supporting the importance of the inflammatory response in patients with BP, we showed an increase in CXCL10 expression in body fluids and skin tissue from patients with BP compared with that seen in age- and sex-matched control subjects. CXCL10 levels were further enhanced in the serum of patients with BP who experienced a relapse during the first year of treatment. Of note, monocytes, but not lymphocytes, from patients with BP responded to CXCL10 by secreting higher levels of activated MMP-9, demonstrating a new inflammatory cascade implicated in the pathophysiology of the disease. Of note, CXCL10 expression could be enhanced by itself and IL-17 in monocytes and lymphocytes isolated from patients with BP, respectively, potentially creating an amplification mechanism of the inflammatory response in patients with BP.

At the time of diagnosis, CXCL10 concentrations were increased in the serum of patients with BP with respect to those in age-and sex-matched control subjects, but this was informative of neither disease severity nor later disease relapse. Then our results at baseline did not confirm a previous study performed on a smaller series, suggesting that the serum level of CXCL10 was associated with disease severity.[12] This discrepancy might rely on the different approaches of disease severity determination because Nakashima et al[12] studied CXCL10 levels with respect to the body surface affected, whereas we investigated CXCL10 level with respect to the number of daily blisters. Therefore further studies should be performed by using the Bullous Pemphigoid Disease Area Index score[36] to better elucidate the relationship between CXCL10 concentration and disease activity. Nevertheless, our longitudinal analysis revealed that CXCL10 levels further increased at day 60 after the first 2 months of treatment in patients with BP who later relapsed, although they all experienced clinical control on therapy within the first 2 months of treatment. This supports our previous study showing that serum contains markers of disease outcome, such as BP180 autoantibodies,[1] IL-17, and IL-23.[6] Here we showed that variation in the CXCL10 serum concentration is also a marker of BP outcome.

CXCL10 was highly expressed in lesional skin of patients with BP. Both inflammatory infiltrating cells and skin-resident cells (keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells) produced CXCL10. Therefore our results are in line with previous studies showing that CXCL10 is produced by a large variety of cell types

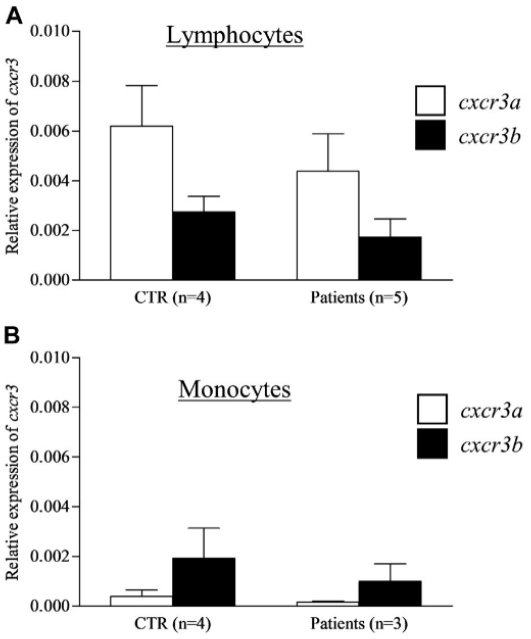


FIG 5. Expression of CXCR3A and CXCR3B isoforms in lymphocytes and monocytes. CXCR3A and CXCR3B mRNA expression in lymphocytes **(A)** and monocytes **(B)** isolated from control subjects and patients with BP. *CTR,* Control subjects.

in both patients with organ-specific and those with systemic autoimmune diseases.[11,14] In patients with those autoimmune diseases, CXCL10 expression was upregulated after cell stimulation with IFN-γ and further enhanced when costimulated with TNF-α,[11,14] 2 cytokines overexpressed at the site of lesions in patients with BP.[37] In addition to these cytokines, we showed that IL-17, another inflammatory cytokine largely expressed in blister fluid from patients with BP,[5] also increased *CXCL10* expression in monocyte-derived macrophages issued from patients with BP. Of note, IL-17 was shown to induce *CXCL10* expression by keratinocytes.[38] Accordingly, high expression of CXCL10 by infiltrating cells was almost always concomitant to high expression of CXCL10 by skin-resident cells. This suggests an important role of IL-17 in CXCL10 production in lesional skin from patients with BP and could explain the large amount of CXCL10 detected in the blister fluid at time of diagnosis. In this setting the BF/serum ratio would rather favor a tissue local synthesis of CXCL10 by influxed inflammatory cells, as well as by keratinocytes and fibroblasts, during the onset of the active disease. However, skin from patients with BP is rapidly cleared of all clinical signs under treatment. Therefore one can assume that the main source of sustained or even increased CXCL10 serum concentrations observed in some patients with BP is more likely related to circulating cells.

Indeed, we observed that *CXCL10* expression could be upregulated by itself and by IL-17, respectively, in monocytes and lymphocytes isolated from patients with BP. Such a dual trigger could be a requirement for the formation of an amplification feedback loop and the perpetuation of the autoinflammatory process. This need for a costimulatory effect could reflect immune cell interplay and explain why CXCL10 concentrations only increase in serum of patients with BP who will relapse during the first year of treatment but not in those of patients with BP with ongoing remission. Indeed, we have previously shown that sustained IL-17 and IL-23 concentrations occurred only in patients with BP who later had a relapse.[6] Therefore it appears very important to determine the orchestrated network of chemokines and cytokines that contributes to the pathophysiologic mechanisms of BP progress.

CXCL10 increased MMP-9 secretion from monocytes and neutrophils but not from lymphocytes. Such an effect, observed with cells isolated from patients with BP but not healthy donors, could not be explained by the difference in expression of CXCR3 isoforms. Interestingly, monocytes responded to CXCL10 to produce both MMP-9. Such responsiveness could be related to the fact that monocytes from patients with BP are preactivated by a network of inflammatory molecules released by different types of circulating immune cells. In this line it was shown that $CD14^+CD56^+$ monocytes also expressing CD16 were more prone to express inflammatory cytokines, such as IL-1β and IL-23, and were expanded in conditions associated with inflammatory and autoimmune diseases.[39-41] Although this monocyte subset still need to be investigated in patients with BP, one can notice that IL-23 is overexpressed in the serum of patients with BP compared with expression in age- and sex-matched control subjects and is even increased in the serum of patients with BP who later experience a relapse.[6] Because CXCL10 increases its own production by monocytes in some patients with BP, this could further amplify MMP-9 production in those patients. Furthermore, it was shown that CD16/FcγRIII mediates tissue destruction in a mouse model of BP,[42] which fits with the fact that CXCL10 induced MMP-9 expression from monocytes and neutrophils, as well as human leukocyte elastase activity from neutrophils (approximately 2.5-fold, data not shown), 2 proteinases involved in blister formation. Therefore, like IL-17 and IL-23,[6] CXCL10 could enhance tissue damage, feeding the autoimmune process thereof. Subsequently, the inhibition of CXCL10-induced proteases would certainly help to control BP progression.

It is of interest that the use of compound A, a selective glucocorticoid receptor activator ligand that preserves the therapeutic effect of glucocorticoids with fewer adverse effects,[33] was as effective as methylprednisolone in inhibiting CXCL10-induced MMP-9. Accordingly, compound A was shown to inhibit the activation of several transcription factors, such as activator protein 1, involved in MMP-9 expression by suppressing activation of the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling cascades.[43] However, it remains to be determined whether such treatment could be effective in reducing CXCL10-induced MMP-9 *in vivo* and whether its efficiency varies according to BP outcome.

In conclusion, our study further documents the inflammatory responses in patients with BP and showed that CXCL10 level determination should be included in the inflammatory molecule panel constituting the BP "inflammascore" we previously proposed.[6] We also provide new evidence that monocyte preactivation by inflammatory molecules in serum of patients with BP could be crucial in the pathophysiologic process of BP. Finally, we showed that it is worth paying attention to selective glucocorticoid receptor activators, such as compound A, which might be potentially useful in reducing the numerous adverse events and

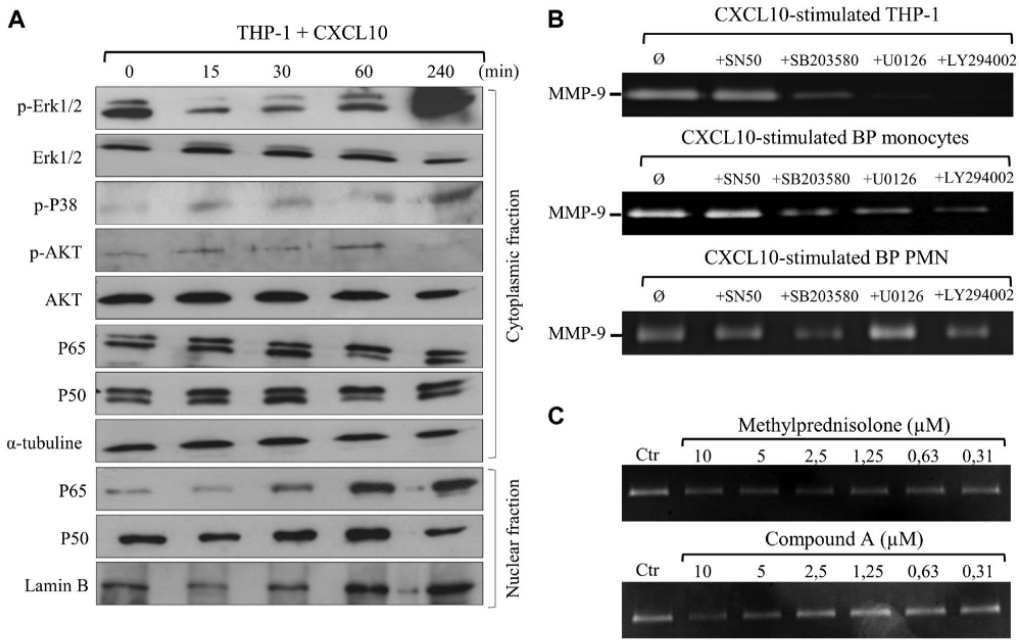


FIG 6. Signaling pathways involved in CXCL10-induced MMP-9 secretion. **A,** Western blotting analysis of signaling pathway activation in CXCL10-stimulated THP-1 cells. **B,** Effects of specific inhibitors for AKT (LY294002), ERK (U0126), p38 (SB203580), and NF-κB (SN50) on CXCL10-induced MMP-9 activity in THP-1 cells, monocytes, and PMN cells. **C,** Dose effects of methylprednisolone or compound A on CXCL10-induced MMP-9 activity in THP-1 cells.

glucocorticoid resistance induced by classical corticosteroid treatment of patients with BP.

We thank Michael Maizières for technical assistance during the study and the Plateforme IBiSA "Imagerie Cellulaire et Tissulaire" for providing microscopy equipment.

Key messages

- **BP relapse is associated with an increase in CXCL10 concentration.**
- **In patients with BP, neutrophils and monocytes, but not lymphocytes, responded to CXCL10 by increasing MMP-9 release, potentially creating an inflammatory loop associated with disease outcome.**
- **Compound A, a novel nonsteroidal glucocorticoid receptor ligand, inhibited CXCL10-induced MMP-9 secretion.**

REFERENCES

1. Fichel F, Barbe C, Joly P, Bedane C, Vabres P, Truchetet F, et al. Clinical and immunologic factors associated with bullous pemphigoid relapse during the first year of treatment: a multicenter, prospective study. JAMA Dermatol 2014;150:25-33.
2. Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, et al. Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. J Am Acad Dermatol 2012;66:479-85.
3. Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. Arch Dermatol 2000;136:174-8.
4. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, et al. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. Clin Immunol 2008;128:415-26.
5. Le Jan S, Plée J, Vallerand D, Dupont A, Delanez E, Durlach A, et al. Innate immune cell-produced IL-17 sustains inflammation in bullous pemphigoid. J Invest Dermatol 2014;134:2908-17.
6. Plée J, Le Jan S, Giustiniani J, Barbe C, Joly P, Bedane C, et al. Integrating longitudinal serum IL-17 and IL-23 follow-up, along with autoantibodies variation, contributes to predict bullous pemphigoid outcome. Sci Rep 2015;5:18001.
7. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. J Clin Invest 1993;92:2480-8.
8. Hirose M, Recke A, Beckmann T, Shimizu A, Ishiko A, Bieber K, et al. Repetitive immunization breaks tolerance to type XVII collagen and leads to bullous pemphigoid in mice. J Immunol 2011;187:1176-83.
9. Oswald E, Sesarman A, Franzke C-W, Wölfle U, Bruckner-Tuderman L, Jakob T, et al. The flavonoid luteolin inhibits Fcγ-dependent respiratory burst in granulocytes, but not skin blistering in a new model of pemphigoid in adult mice. PLoS One 2012;7:e31066.
10. D'Auria L, Cordiali Fei P, Ameglio F. Cytokines and bullous pemphigoid. Eur Cytokine Netw 1999;10:123-34.
11. Lee EY, Lee Z-H, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2009;8:379-83.
12. Nakashima H, Fujimoto M, Asashima N, Watanabe R, Kuwano Y, Yazawa N, et al. Serum chemokine profile in patients with bullous pemphigoid. Br J Dermatol 2007;156:454-9.
13. Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. Ann N Y Acad Sci 2009;1173:310-7.
14. Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2014;13:272-80.
15. Bondar C, Araya RE, Guzman L, Rua EC, Chopita N, Chirdo FG. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. PLoS One 2014;9:e89068.
16. Huen AC, Wells A. The beginning of the end: CXCR3 signaling in late-stage wound healing. Adv Wound Care (New Rochelle) 2012;1:244-8.

17. Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, et al. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 1997;100:1256-63.
18. Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, et al. Gelatinase B–deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. J Exp Med 1998;188:475-82.
19. Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ, et al. A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 2000; 105:113-23.
20. Sitaru C. Bullous pemphigoid: a prototypical antibody-mediated organ-specific autoimmune disease. J Invest Dermatol 2009;129:822-4.
21. Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, et al. The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. Cell 2000;102:647-55.
22. Lin L, Bankaitis E, Heimbach L, Li N, Abrink M, Pejler G, et al. Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. J Biol Chem 2011;286:37358-67.
23. Niimi Y, Pawankar R, Kawana S. Increased expression of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 in lesional skin of bullous pemphigoid. Int Arch Allergy Immunol 2006;139:104-13.
24. Verraes S, Hornebeck W, Polette M, Borradori L, Bernard P. Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid. J Invest Dermatol 2001;117:1091-6.
25. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker EB, Opdenakker G, et al. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. J Pathol 2004;204:519-27.
26. Yancey KB. The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. J Clin Invest 2005;115:825-8.
27. Sitaru C, Zillikens D. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. Exp Dermatol 2005;14:861-75.
28. Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, et al. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. Leukemia 2015;29:145-56.
29. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, et al. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. J Exp Med 1993;177:1809-14.
30. Jinquan T, Jing C, Jacobi HH, Reimert CM, Millner A, Quan S, et al. CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. J Immunol 2000;165:1548-56.
31. Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, et al. Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. J Immunol 2008; 181:8053-67.
32. Vaillant L, Bernard P, Joly P, Prost C, Labeille B, Bedane C, et al. Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group. Arch Dermatol 1998;134:1075-80.
33. Lesovaya E, Yemelyanov A, Swart AC, Swart P, Haegeman G, Budunova I. Discovery of compound A—a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity. Oncotarget 2015;6:30730-44.
34. Emonard H, Hornebeck W. Binding of 92 kDa and 72 kDa progelatinases to insoluble elastin modulates their proteolytic activation. Biol Chem 1997;378:265-71.
35. Antonicelli F, Brown D, Parmentier M, Drost EM, Hirani N, Rahman I, et al. Regulation of LPS-mediated inflammation in vivo and in vitro by the thiol antioxidant Nacystelyn. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;286:L1319-27.
36. Zhao CY, Murrell DF. Outcome measures for autoimmune blistering diseases. J Dermatol 2015;42:31-6.
37. Takematsu H, Ohta H, Tagami H. Determination of tumor necrosis factor in blister fluids of bullous pemphigoid. Arch Dermatol Res 1991;283:131-2.
38. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. J Invest Dermatol 2008;128:2625-30.
39. Krasselt M, Baerwald C, Wagner U, Rossol M. CD56+ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis and immunosenescence. Arthritis Res Ther 2013;15:R139.
40. Krasselt M, Baerwald C. The current relevance and use of prednisone in rheumatoid arthritis. Expert Rev Clin Immunol 2014;10:557-71.
41. Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2007;13:566-72.
42. Schulze FS, Beckmann T, Nimmerjahn F, Ishiko A, Collin M, Köhl J, et al. Fcγ receptors III and IV mediate tissue destruction in a novel adult mouse model of bullous pemphigoid. Am J Pathol 2014;184:2185-96.
43. Yemelyanov A, Czwornog J, Gera L, Joshi S, Chatterton RT, Budunova I. Novel steroid receptor phyto-modulator compound a inhibits growth and survival of prostate cancer cells. Cancer Res 2008;68:4763-73.

ARTICLE IN PRESS

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME ■■■, NUMBER ■■

METHODS

Plasmid construction and cell transient transfection

The open reading frame of CXCR3A (NM_001504) and CXCR3B (NM_001142797) of the constructs pENTR-*CXCR3A* and pENTR-*CXCR3B* were cloned in pDEST47 plasmid by using Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen). Constructs were sequence verified before use.

Transfection of pDEST47-*CXCR3A* and pDEST47-*CXCR3B* constructs into THP-1 cells was performed with the Amaxa Nucleofector system and the Cell Line Nucleofector kit V, according to the manufacturer's recommendations, with program U-001 for high viability, to overexpress CXCR3A and CXCR3B receptors. Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated or not with CXCL10 (500 pg/mL) in serum-free medium for 24 hours before harvest to analyze MMP-9 expression.

CXCL10 expression analysis in biological fluids

Blood samples from patients with BP and healthy control subjects were collected at baseline and at day 60 for serum measurement of CXCL10. Collected blood samples were centrifuged for 10 minutes at 1000*g*. Serum aliquots were stored at −80°C until being tested for the chemokine concentration by using specific CXCL10 ELISA kit, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, Minn). Cytokine concentration was determined by using 100 μL of serum.

CXCL10 and CXCR3 expression at the lesional site by means of immunohistochemistry

All perilesional skin biopsy specimens performed in patients with BP before introduction of any corticosteroid treatment were obtained from the Anatomo-Pathology Department of Reims Hospital. Tissues were fixed in paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned. Immunostaining with a polyclonal anti-human CXCL10 (sc-101500, Santa Cruz Biotechnology) antibody or an anti-human CXCR3 mAb (MAB160, R&D Systems) was performed by using routine methods with, respectively, a biotinylated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (BA-1100 and BA-2000, respectively; Vector Laboratories, Burlingame, Calif) and the ABC-peroxidase complex (Vector Laboratories) with diaminobenzidine-H_2O_2 used as the chromogen for detection.

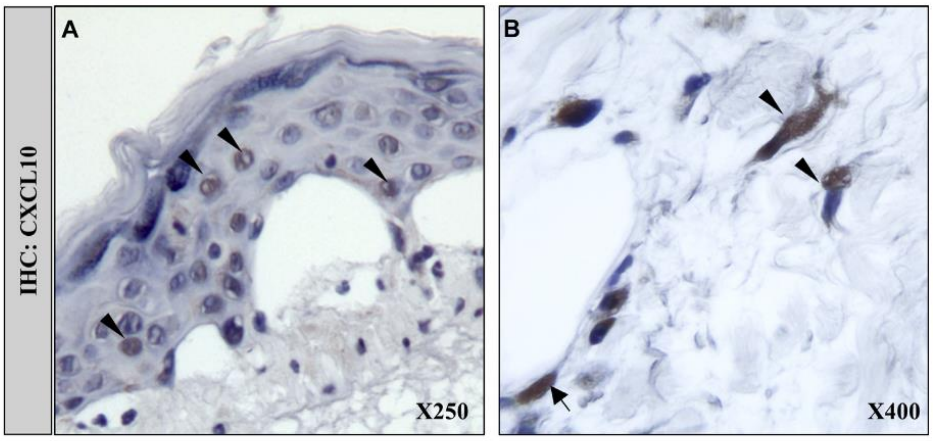


FIG E1. CXCL10 expression in nonimmune resident cells at the lesion site in patients with BP. CXCL10, as analyzed by using immunohistochemistry *(IHC)*, was expressed by keratinocytes (indicated by *arrowheads* in **A**) and fibroblasts and vascular cells (indicated by *arrowheads* and the *arrow*, respectively, in **B**) at the lesion site in skin biopsy specimens from patients with BP.

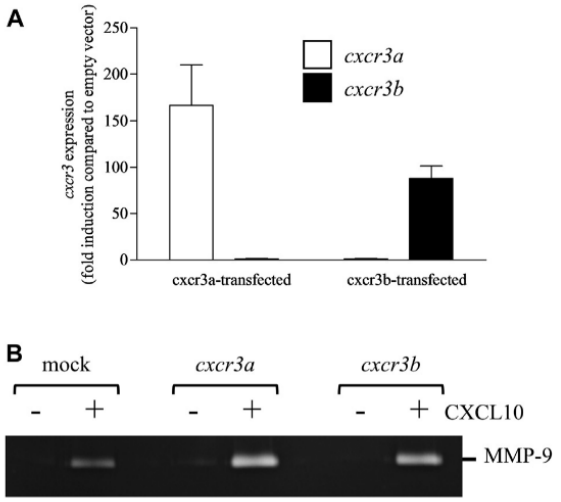


FIG E2. Overexpression of both CXCR3A and CXCR3B increased MMP-9 activity in a monocytic cell line. **A,** *CXCR3A* and *CXCR3B* expression analyzed by using quantitative RT-PCR in a *CXCR3A*- or *CXCR3B*-transfected THP-1 cell line with respect to the empty vector-transfected THP-1 cells. **B,** MMP-9 activity measured by using zymography in *CXCR3A*- or *CXCR3B*-transfected THP-1 cells stimulated or not with CXCL10.

B. Rôle de la polarisation des macrophages dans la physiopathologie de la PB

1. Synthèse

Contexte de l'étude :

La PB est caractérisée par une cascade inflammatoire conduisant à la formation de la bulle. Il a été démontré que les macrophages participent dans cette cascade en formant une boucle d'amplification avec les mastocytes pour le recrutement des neutrophiles [48]. De plus, ces cellules sont fortement présentes dans l'infiltrat de cellules inflammatoires observé dans la PB et peuvent même avoir un rôle direct dans la dégradation de la matrice puisqu'elle secrètent la MMP-9 [48]. D'autre part, plusieurs études ont montré un rôle important de la polarisation des macrophages (sous types M1, M2a, M2b et M2C) dans les maladies autoimmunes [121], et dans les processus inflammatoires [125]. Dans un travail précédent, notre équipe a montré que la PB est associée à une production d'IL-23 dans le sérum et dans le liquide de bulle [64] [63], un marqueur de polarisation de type M1[126] [64] [127], ce qui est en accord avec l'expression de CXCL10 observée dans la première partie de ce travail de thèse. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la polarisation des macrophages dans la PB peut jouer un rôle dans la réaction inflammatoire et dans les mécanismes de dégradation de la matrice via notamment la production de la MMP-9.

Objectifs :

Dans ce travail, nous avons cherché à déterminer l'effet des sérums de patients et du LB dans l'expression des marqueurs de polarisation des macrophages à savoir CXCL10, CD163, CD206, et d'étudier l'éventuelle association avec l'expression de la MMP-9 dans cette polarisation. Finalement, comme les corticostéroïdes sont largement utilisés pour le traitement des patients, nous avons aussi analysé l'effet du méthylprénisolone et du composé A, dont on a montré dans notre précédente étude *(Publication n°1)* qu'il mime les effets des corticostéroïdes, dans l'expression des marqueurs de polarisation et dans l'expression de la MMP-9 associée aux macrophages.

Méthodes

Des sérums de patients (n=12), des liquides de bulles (n=8), ainsi que des monocytes isolées à partir des cellules inflammatoires primaires de patients ou de sujets sains (n=7), ont été utilisés pour analyser l'expression de CXCL10, du CD163 et du CD206 en association avec l'analyse de l'expression de la MMP-9.

Résultats

Les macrophages issus de monocytes de patients ou les macrophages issus de monocytes de sujets sains, incubés avec du sérum de patients ou avec du sérum de sujets sains augmentent l'expression du CXCL10, du CD163 et du CD206, avec un effet plus important sur l'expression de CXCL10 en présence du sérum de patients (n=7, p=0,007). Toutefois, en présence du liquide de bulle les expressions du CD163 et du CD206 augmentent alors que l'expression de CXCL10 ne varie pas. L'expression de la MMP-9 est reliée à une polarisation de macrophages de type M2. Finalement, l'inhibition de l'expression de la MMP-9 par le méthylprednisolone est associée à une augmentation de l'expression du CD163 et du CD206, alors que le composé A inhibe l'expression de la MMP-9 sans aucun effet sur la polarisation.

Conclusion

Notre étude montre que la plasticité des macrophages dans la PB est un processus séquentiel initié dans un premier temps par le sérum qui préactive les cellules et dans un deuxième temps par le liquide de bulle qui différencient les macrophages préactivés en une polarisation M2. Nos résultats montrent aussi que l'expression de la MMP-9 est associée avec une polarisation de macrophages de type M2 dans la PB. Enfin, nous avons montré que le composé A, un activateur sélectif des récepteurs des glucocorticoïdes qui préserve l'effet thérapeutique des glucocorticoïdes avec des effets secondaires réduits, était aussi efficace que la méthylprednisolone dans l'inhibition de la MMP-9 mais avec des effets différents sur l'expression des marqueurs de polarisation des macrophages.

2. Publication n°2 :

Blister fluid triggers MMP-9 and M2 phenotype like polarization in monocyte-derived macrophages with serum from bullous pemphigoid patients.

Meriem Riani, Sebastien Le Jan, Camille Bour, Philippe Bernard, and Frank Antonicelli.

(Manuscrit en cours de finalisation pour publication)

Blister fluid triggers MMP-9 and M2 phenotype like polarization in monocyte-derived macrophages with serum from bullous pemphigoid patients.

Riani M., MS,[1] Le Jan S., PhD,[1] Camille Bour, MS, [1] Bernard P., MD, PhD,[1, 2,] Antonicelli F., PhD,[1, 2,*].

Affiliations:

[1]Laboratory of Dermatology, EA7319 Derm-I-C, University of Reims-Champagne-Ardenne, Reims, 51 rue Cognacq Jay, 51095 REIMS Cedex, France

[2]Department of Dermatology, University Hospital, University of Reims-Champagne-Ardenne, Reims, avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France

* **Corresponding author:** Pr Antonicelli Frank

Laboratory of Dermatology, EA-7319 Derm-I-C, University of Reims-Champagne-Ardenne, Reims, 51 rue Cognacq Jay, 51095 REIMS Cedex, France

E-Mail: frank.antonicelli@univ-reims.fr

ABSTRACT

Background: Bullous pemphigoid (BP) is a cutaneous autoimmune disease, characterized by an inflammatory cascade leading to blister formation. Although macrophages were showed to participate in the disease pathophysiological process, their role in MMP-9 production still needs to be investigated.

Objective: We addressed the influence of serums and blister fluids from patients with BP on the expression of MMP-9 by macrophages with regards to those of markers of cell polarization**.**

Methods: BP serum (n=12), blister fluid (n=8) and monocytes from either patients with BP (n=7) or control subjects were used to analyse expression of CXCL10, CD163 and CD206 expression by monocyte-derived macrophage (MDM) in association with their capacity to produce MMP-9.

Results: Differentiation of monocytes from patients with BP with serum from patients BP into MDM increased CXCL10 expression (n=7, *P*=0,007), whereas MDM from both control subjects and patients with BP expressed high levels of CD163 and CD206. In contrast, the expression of CD163 and CD206, but not CXCL10 was increased in presence of blister fluids (BF). Meanwhile the expression of MMP-9 was related to serum stimulation either from control or from patients with BP but not upon blister fluids stimulation. Finally, inhibition of MMP-9 expression by methylprednisolone was associated with a further increase in CD163 and CD206, whereas the compound A mainly inhibited both MMP-9 and CXCL10 expression.

Conclusion: Our study highlights the critical role of serums from patients with BP in MMP-9 expression by monocytes-derived macrophages, and in their response to blister fluids stimulation. Furthermore, we showed that the expressions of the CD163 and CD206 associated M2 macrophages markers are dependent on skin environment in BP.

Key words: Bullous pemphigoid; autoimmunity; inflammation; macrophage polarization; MMP-9; Compound A

INTRODUCTION

Bullous pemphigoid (BP) is a cutaneous autoimmune disease occurring in the elderly [1]. The disease is characterized clinically by subepidermal blisters, and biologically by the production of autoantibodies directed against the two components of the hemidesmosome, BP230 and BP180 and a dermal inflammatory infiltrate. A variety of cellular types have been identified in the dermal inflammatory infiltrate, including eosinophils, neutrophils, lymphocytes, mast cells, and macrophages [2][3]. Macrophages, were shown to mediate neutrophil infiltration through mast cell activation [4]. In addition, a recent study showed the presence of CD163+ CD206+ macrophages in the lesional skin of patients with BP [5]. However, the role of macrophages polarization and especially in the production of the protease MMP-9 has not been properly elucidated in BP.

Macrophages display remarkable plasticity and can change their physiology in response to environmental with at the extreme side of this plasticity the inflammatory or classically activated macrophages M1 phenotype and on the other extremity the anti-inflammatory or alternatively activated macrophages M2 phenotype [6]. The M1 phenotype is induced by microbial products or pro-inflammatory cytokines such as IFN-γ and TNF, whereas molecules such as IL-4, IL-13, M-CSF, immune complexes, IL-10, and glucocorticoid favour the orientation of the M2 type macrophages. In addition, the M1 type macrophages have been shown to produce high levels of inflammatory associated molecules such as TNF-α, IL-1, IL-6, IL-23, IL-12, type I IFN, reactive nitrogen intermediate (RNI), reactive oxygen intermediate (ROI), CXCL9, CXCL10, and CXCL11[7], whereas express IL-4, IL-10, CD163 and CD206 for instances and promoted tissue regeneration and repair [8] [9]. In turn, some studies have shown that a switch in macrophage phenotype from M1 to M2 could influence the pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases [10] [11] [12]. In line with the previous report on macrophages polarisation in BP, the presence of immune complexes at the skin lesional sites

should favour the presence of M2 type macrophages. However, we recently showed that BP disease was associated with the production of IL-23 and CXCL10, 2 markers of the M1 macrophages phenotype [13] [14] [15] . Due to the complex composition of the serum and blister fluids from patients with BP, we wondered what could be the influence of these body fluids on macrophages polarisation and activity, evaluated by the production of MMP-9, a metalloproteinase largely involved in blister formation.

We here aimed at understanding the influence of serum and blister fluids of patients with BP on macrophage polarization by analysing CXCL10, CD163 and CD206 expression and sough a relationship with MMP-9 expression in those conditions of stimulation as corticosteroids are commonly used to treat patients BP, we also analysed the effect of such a treatment by methylprenisolone on the expression of these macrophages markers and on MMP-9 expression. Finally, In line with experiments performed in our laboratory [15] and others [16] [17] , we also investigated the influence of a non-steroidal potential therapeutic agent mimicking corticosteroids on the expression of M1/M2 markers and those of mmp-9, to know whether such a molecule display effects similar to corticosteroids on macrophage associated phenotype in BP.

METHODS

Study Patients and Design

The study was conducted with the collaboration of the dermatology department of the Reims university hospital. Consecutive patients with newly diagnosed BP were included using the following criteria: clinical features typical of BP with presence of at least three out of four well-established criteria by Vaillant et al [18]; subepidermal blister on skin biopsy; and deposits of IgG and/or C3 in a linear pattern along the epidermal basement membrane zone by direct IF. Patients or their relatives received an information letter and gave an oral consent. Serum samples from age- and sex-matched patients without inflammatory and autoimmune diseases admitted to the trauma department of the Reims University Hospital were used as controls. All voluntary subjects gave their written informed consent prior to inclusion in the study.

Cell preparation

THP-1 monocytic cell line, kindly provided by Dr S. Hart from University of Edinburgh, UK, was cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM Glutamine, 25 U/ml penicillin, and 25 U/ml streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from control subjects or BP patients were obtained by density-gradient centrifugation from EDTA-treated whole blood using a density gradient medium (Granulosep, Eurobio-Abcys). Monocytes were purified from PBMCs by positive selection using CD14 immunomagnetic beads (MACS; Miltenyi Biotech) according to manufacturer instructions.

THP-1-derived macrophages were generated as described previously [19]. Briefly THP-1 cells were seeded at a concentration of 2.10^6 cells per milliliter in FBS-free medium and treated with 320 nM PMA for 24 hours. To generate M1-polarized THP-1 macrophages, THP-1 cells were treated with 320 nM PMA for 6 hours and then cultured with PMA plus 20 ng/ml IFN- γ and

20 ng/ml TNFα for 18 hours. To generate M2-polarized THP-1 macrophages, THP-1 cells were treated with 320 nM PMA for 6 hours, and then cultured with PMA plus 20 ng/ml IL10 for another 18 hours. Cells and culture media were then harvested and analysed for gene expression and MMP-9 secretion.

For stimulation, THP-1 cells were treated with 320 nM PMA in FBS-free medium for 6 hours and then cultured for 18 hours with 320 nM PMA plus 10% BF or 10% serum from control subjects (CTR serum) or BP patients (BP serum) , methylprednisolone (Sigma) or Compound A [17] were introduced with serum at a concentration of 10µM. Cells were then harvested and analysed for gene expression.

To generate Monocyte –derived macrophage (MDM), freshly isolated human Monocyte from control subjects or BP patients were cultured at a concentration of 2.10^6 cells per milliliter for 4 days in RPMI 1640 medium (Life Technologies), 2 mM Glutamine, 25 U/ml penicillin, 25 U/ml streptomycin and 10% serum from control subjects or BP patients. MDM was obtained by removing the culture media at day 4 and culturing cells for an additional 3 days.

For stimulation, MDM were treated for 24h with 10% BF simultaneously or not with methylprednisolone (Sigma) or Compound A. Cells were then harvested and analysed for gene expression.

Gene expression analysis

Total RNA from isolated and cultured cells was extracted using TRI-Reagent (Euromedex). Reverse transcription was performed from 1µg of total RNA using Maxima First Strand cDNA kit with dsDNAse (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. *cxcl10, CD163, CD206 and mmp9* gene expression was analysed by real-time PCR using Platinum

SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen) on the LightCycler system (Roche Diagnostics). Relative quantification was performed using the *GAPDH* as a reference gene.

Zymography

Quantity of MMP-9 was determined on conditioned media by the zymography technique. Briefly, samples were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel impregnated with 0.1% of gelatin as substrat under non-reducing conditions [20]. The gels were subsequently fixed and stained with 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 to visualize the proteolytic activity bands. Quantification was performed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD)

Statistical analysis

Experiments were performed in THP-1 at least three times. Experiments in MDM were made on at least 6 different monocytes from control subjects or BP patients, using for each between 6 and 12 serum samples and BF. Differences between variables were evaluated using the non-parametric Mann–Whitney test and Wilcoxon test. The results were considered significant if p values were 0.05 or less.

RESULTS

Effects of serum and blister fluids from patients with BP on macrophages polarization

We first tested the influence of serum from patients with BP compared with serum from control subjects on macrophages polarization by mean of the THP-1 monocytic cell line differentiated into macrophages upon PMA stimulation. The stimulation of THP-1 derived macrophages with serum displayed higher expression levels of all 3 markers analysed compared with the non-stimulated THP-1 derived macrophages (NS) (Figure 1). The increase in CXCL10 expression was even higher in THP-1 cells stimulated with serum from patients with BP collected at time of diagnosis than in cells stimulated with serum from control subjects, whereas no differences was observed in the expression of CD163 and CD206 expression levels.

In addition, we found that THP-1 derived macrophages stimulated with blister fluids displayed specific profiles compared with serum (Figure 1). Conversely to the serum effects, THP-1 cells stimulated in presence of blister fluids did not enhanced CXCL10 expression compared to the non-stimulated THP-1 derived macrophages. Nevertheless, THP-1 macrophages differentiation was characterized by an increase in the expression of both CD163 and CD206 macrophage M2 markers, with an increase in CD206 that was even higher than those obtained in cells stimulated with serum ($P<0.05$). Together these results showed that the serums from patients with BP are more likely to activate rather to orientate macrophage polarization, although the increase in CXCL10 was more pronounce with serum from patients with BP than with control subjects. In addition these results showed that blister fluids from patients with BP favour the macrophages orientation towards a M2 phenotype.

Influence of monocyte on monocyte-derived macrophages polarization.

The stimulation of monocytes with their autologous serum conducted to an increase of CXCL10 expression when cells and serum had been collected from patients with BP, Whereas CXCL10 mRNA level remained undetectable with samples from control subjects. Meanwhile, no variations were noticed in CD163 and CD206 expression levels in those conditions of analyses (Figure 2), suggesting that BP disease conditions tend to differentiate macrophages towards a M1 profile.

To define the influence of both the serum and the cells in such a macrophage favoured polarization, we developed 2 sets of experiments. To demonstrate the importance of the serum in macrophage polarisation, we compared the effects of serum from either patients with BP or from control subjects both on monocytes-derived macrophages (MDM) from control subjects (CTR). In CTR MDM, serum from patients with BP and from control subjects did not induced CXCL10 expression, and had similar effects on CD163 mRNA expressions (Figure 2). However, serums from patients with BP significantly increased CD206 mRNA expression compared with serum from control subjects ($P<0.05$).

In addition, we investigated whether the circulating monocytes themselves could interfere on macrophages polarisation by comparing the effects of serums from patients with BP on both MDM from patients with BP and from control subjects (Figure 2). Incubation of monocytes from patients with BP with serum from patients with BP (BP-MDM + BP serum) led to an increased in CXCL10 expression, which was not observed with monocytes from control subjects (CTR-MDM + BP serum). In those conditions, no difference was observed in the level of CD163 expression, whereas the expression level of CD206 was significantly decreased in MDM issued from patients with BP compared with those from control subjects ($P<0.001$). Together these results suggest that both serums and monocyte cells interfered in the process of macrophages activation.

Influence of blister fluids on serum-induced macrophages polarization.

We then wondered whether the effects of blister fluids on macrophages polarization were conditioned by pre-incubation of monocytes with serums from patients with BP (Figure 3). When BP-MDM differentiated in presence of serum from patients with BP were further incubated with blister fluids, the expression of all 3 markers was increased, but such an increase was only significant for CD163 and CD206 ($P<0.05$), suggesting that blister fluids rather favour a M2 type macrophage polarisation.

As we above showed the influence of serums on macrophage activation, we repeated these experiments using serum collected after treatment at the end of the patients follow up (Figure 3). In these conditions, the basal expression levels of all 3 markers were similar to those observed with the serum collected at the time of diagnosis. However, following such pre-stimulation, the CXCL10 expression remained low even in presence of blister fluids co-stimulation. Also, only the expression of CD206 was still significantly increased upon blister fluids stimulation but not CD163 expression. Although these results still argue in favour of M2 polarisation upon blister fluids stimulation, it also suggests that the effects of blister fluids are conditioned by the serum used to differentiate monocytes into macrophages.

Expression of MMP-9 by macrophage orientated by serums and blister fluids from patients with BP

First, we used the THP-1 derived macrophage model to test the effects of serums from either patients with BP or control subjects, as well as the direct effects of blister fluids on MMP-9 mRNA expression. Compared with the non-stimulated THP-1 derived macrophages used as control, we did not observe significant variations in the expression of the MMP-9 mRNA level, whatever the stimulus used (Figure 4A). We then investigated the relevance of MMP-9

expression as a marker of macrophage polarization. To that purposes, we generated M1 and M2 types macrophages from THP-1 derived macrophages upon PMA stimulation (M0) by means of specific cytokines stimulation, and measured the level of MMP-9 secreted in these conditions (Figure 4B). Macrophages polarisation into M2 type upon IL-10 stimulation secreted a significant higher level of MMP-9 compared with non-stimulated THP-1 macrophages ($P<0.01$), whereas the quantity of MMP-9 secreted by M1 orientated macrophages in presence of IFN and TNFα was reduced compared with control THP-1 macrophages ($P<0.001$). These effects observed at the protein level, by means of gel zymography technique, were confirmed at the MMP-9 mRNA level (Figure 4C), further demonstrating that the expression of MMP-9 varies according to macrophages polarisation.

Conversely to THP-1 derived macrophages stimulated with serums, monocytes derived into macrophages from patients with BP with their autologous serum (BP-MDM + BP serum) expressed significantly higher level of MMP-9 mRNA compared to macrophages from control subjects differentiated with their own serum ($P<0.001$) (Figure 4D). However, these effects were not directly related to the serum of patients with BP as those serums did not modulated the level of MMP-9 mRNA expressed by monocyte-derived macrophages from control subjects. In addition, the level of MMP-9 expressed by monocytes derived macrophages from patients with BP was similar when the differentiation had been performed in presence of serum collected either at the time of diagnosis or at the end of the follow up after treatment (Figure 4E). Finally, co-stimulation with blister fluids did not modulate the level of MMP-9 mRNA expressed by those cells (Figure 4E).

Effects of corticosteroid treatment on MMP-9 expression and macrophages polarisation

We then wondered whether treatment with methylprednisolone (MP) and a novel glucocorticoid receptor ligand (compound A, CPA) influenced the expressions of both M1/M2

macrophage markers and MMP-9. The effects of these molecules were tested in the different model above described to highlight the role of serum and blister fluid either on THP-1 macrophages (Figure 5A) or on monocytes derived macrophages (Figure 5 B and C). In cells stimulated with serum from BP patients, the inhibition of MMP-9 expression by MP and CPA at a concentration of 10µM was as effective as in absence of stimulus (Figure 5A) or cells stimulated with serum from control subjects (Figure 5B). Furthermore, these treatments totally abolished the expression of MMP-9 in monocytes derived macrophages in presence of serum of patients with BP and further stimulated with bullous fluid (Figure 5C), but not in THP-1 derived macrophage treated with blister fluids (Figure 5A).

When detectable, the expression of CXCL10 was markedly reduced by CPA treatment but not with MP, which remained ineffective whatever the model used (Figure 5 A and B). In contrast, MP treatments greatly increased both CD163 and CD206 expression in controls, serums and blister fluids stimulated cells, whereas the treatment with CPA was much less effective (Figure 5 A and B). Such increase was not evidenced in cells stimulated with both serum and blister fluid from patients with BP (Figure 5C).

DISCUSSION

We evidenced in this study that macrophages polarisation in BP is dependent on monocytes priming in the blood stream and on factors present in both the serum and the blister fluid of patients with BP. Altogether, this led to macrophages characterized by an increased expression of MMP-9, which could be controlled by treatment with both methylprednisolone and compound A, although these molecules displayed different effects on macrophages polarisation markers.

Macrophages polarisation in patients with BP is a progressive process from blood stream to the site of lesion in the skin. Disease conditions are frequently associated with polarization of macrophage activation, with classically activated M1 macrophages implicated in initiating and sustaining inflammation and M2 macrophages associated with the resolution of the inflammatory process [21]. In BP, monocytes from patients with BP were more prone to express molecules associated with both M1 and M2 type polarisation than those from control subjects, suggesting that monocytes from patients with BP and later macrophages are activated within the blood stream. The subsequent overexpression of CXCL10 is therefore in line with our recent publication showing that CXCL10 is increased in the blood and in the skin of patients with BP [15], supporting the hypothesis that macrophages and CXCL10 are involved in an auto-inflammatory amplification loop by recruiting Th1 lymphocytes and neutrophils, which is consistent with BP pathophysiology mechanisms [22] [23] [24]. However, we also found that serum from patients with BP also increased CD163 and CD206 M2 type markers, showing that macrophages are more activated than orientated by molecules from the serum. Of note, the expressions of CD163 and 206 were also observed with monocyte derived macrophages in presence of serum from patients with BP and serum from healthy controls showing that these expressions were not related to BP disease. Macrophages polarisation was dictated at site of lesion in BP. Indeed, macrophages have plasticity in their gene expression profile that is

influenced by the type, concentration, and time of exposure to the stimulating agents [10]. In BP, blister fluids alone or combined to serum enhanced the expression of CD163 and CD206, supporting a recent study showing the in situ expression of these M2 type markers in BP [5]. This also is in line with a polarization towards the M2 phenotype induced by immune complexes and complement components present in the blister fluids. This result is of interest, as it shows that during the active phase of the disease, molecules within the blister fluid orientate macrophages towards an anti-inflammatory M2 phenotype, which may later influence the skin regeneration process characterized by an absence of scarring. Also of interest is the fact that the effects of blister fluids on macrophages polarization was only effective when the serum used to derive monocytes into macrophages were collected at time of diagnosis, demonstrating that macrophages fate is a sequential process from blood to skin lesion.

In BP, macrophages were associated with an elevated level of MMP-9 expression. Of note, this high level of expression was consecutive to the stimulation with serum, and independent of the presence of blister fluids. In addition, by mean of the THP-1 cell line, we demonstrated that MMP-9 expression is bound to macrophages polarization towards the M2 phenotype. Therefore, according to the level of MMP-9 expressed, one can assume that monocyte derived macrophages with serum from patients with PB are predominantly of the M2 type, although these cells produced both M1 and M2 type molecules. This observation is in line with the levels of expression of the CD163 and CD206 mRNA, which were higher than those of CXCL10. Considering the role of macrophage polarization in their allocated functions, it raises the question of the associated increase in MMP-9 in the pathophysiological process of BP. Indeed, the protease MMP-9 has been shown as a key molecule in blister formation and any increase in its production is thought to feed the autoimmune process thereof. Thus, controlling the amount of MMP-9 locally produced during the active phase of the disease is clinically of prime importance. In addition, patients with BP are treated by corticosteroids over

a period of 6 to 9 months, and occasionally even longer, suggesting that MMP-9 inhibition along the treatment does not alter the scarless regeneration process in BP.

The inhibition of MMP-9 production was not compulsory associated with a switch of macrophages phenotype. The inhibition of MMP-9 expression displayed by methylprednisolone in macrophages in vitro, like in other inflammatory cells, is likely to be representative of the contribution to the therapeutic efficacy of corticosteroids in vivo. In addition, it is now appreciated that the M2 terminology encompasses a functionally diverse group of macrophages, with a M2b phenotype elicited by immune complexes, whereas the M2c phenotype can be induced by glucocorticoids. This M2 orientation upon steroid treatment is in line with the observation that the deletion of MMP-9 stimulates the anti-inflammatory polarization [25], and further questions the role of MMP-9 in wound healing without scarring in BP. In addition, treatment with methylprednisolone increased both CD163 and CD206 in THP-1 macrophages stimulated independently with serum or with blister fluids from patients with BP, and in monocytes differentiated into macrophages with serum, but not when serum and blister fluids treatments were combined. Thus, the effects of methylprednisolone on macrophages polarization could be modulated by skin environment, and therefore vary according to time of treatment. It is widely accepted that M2 phenotype macrophages are beneficial for tissue repairing and restoration of homeostasis in the microenvironment [9]. However, in asthma and in allergy, excessive M2 macrophages may increase Th2 cell recruitment, eosinophils infiltration and mucus secretion, and result in airway hyper-responsiveness [11] [26]. In this line, the M2 macrophages in BP could increase inflammatory cells recruitment and could participate to the inflammatory cascade observed in BP. Several approaches for targeting macrophage polarization are currently under investigation, including the use of adoptive transfer, biologics, micro- and nanoparticles, and probiotics [27]. In this study, we showed that the inhibition of MMP-9 by means of compound A treatment was as

efficient as the treatment with methylprednisolone. Treatment with compound A also decreased CXCL10 expression, also inhibiting the potentially autoinflammatory feedback loop associated to the expression of this molecule. Furthermore, the increase in CD163 and CD206 was much less pronounced upon treatment with compound A than with methylprednisolone, showing that although these 2 molecules inhibit MMP-9 expression, they display different effects on macrophages polarization. However, further studies are required to know whether the discrepancies in these adaptive molecular effects are responsible for the full therapeutic effect of corticosteroid treatment in BP or if such modifications may alter their efficacy.

In this study we showed for the first time that macrophage plasticity in BP is under subtle regulatory mechanisms initiated by serums from patients with BP, which activate monocytes-derived macrophages to express M2 type molecules and to a lesser degree M1 marker. In BP, the macrophages plasticity is further triggered in presence of blister fluid showing that macrophages fate varies according to BP clinical features. We also showed that the protease MMP-9 was associated with a M2 type macrophages phenotype in BP. Finally, the use of Compound A, a selective glucocorticoid receptor activator ligand that preserves the therapeutic effect of glucocorticoids with fewer adverse effects [28], was as effective as a treatment with methylprednisolone in inhibiting MMP-9 but with distinct effects on the expression of macrophages phenotype markers. Thus further investigations are required to know if such a compound could be of interest as a future treatment and if its discriminant effects with corticosteroid interfere on the wound healing process.

REFERENCES

[1] Z. Liu et L. A. Diaz, « Bullous pemphigoid: end of the century overview », *J. Dermatol.*, vol. 28, n° 11, p. 647-650, nov. 2001.

[2] Z. Liu *et al.*, « A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 92, n° 5, p. 2480–2488, nov. 1993.

[3] M. Hirose *et al.*, « Repetitive immunization breaks tolerance to type XVII collagen and leads to bullous pemphigoid in mice », *J. Immunol.*, vol. 187, n° 3, p. 1176-1183, août 2011.

[4] R. Chen *et al.*, « Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation », *J. Immunol.*, vol. 169, n° 7, p. 3987-3992, oct. 2002.

[5] S. Furudate, T. Fujimura, Y. Kambayashi, A. Kakizaki, et S. Aiba, « Comparison of CD163+ CD206+ M2 macrophages in the lesional skin of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris: the possible pathogenesis of bullous pemphigoid », *Dermatology (Basel)*, vol. 229, n° 4, p. 369-378, 2014.

[6] D. M. Mosser et J. P. Edwards, « Exploring the full spectrum of macrophage activation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n° 12, p. 958-969, déc. 2008.

[7] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, et M. Locati, « The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization », *Trends in Immunology*, vol. 25, n° 12, p. 677-686, déc. 2004.

[8] F. O. Martinez, L. Helming, et S. Gordon, « Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, p. 451-483, 2009.

[9] S. Gordon, « Alternative activation of macrophages », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, n° 1, p. 23-35, janv. 2003.

[10] L. Cassetta, E. Cassol, et G. Poli, « Macrophage polarization in health and disease », *ScientificWorldJournal*, vol. 11, p. 2391-2402, 2011.

[11] Y.-C. Liu, X.-B. Zou, Y.-F. Chai, et Y.-M. Yao, « Macrophage polarization in inflammatory diseases », *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 10, n° 5, p. 520-529, 2014.

[12] I. A. Udalova, A. Mantovani, et M. Feldmann, « Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis », *Nat Rev Rheumatol*, vol. 12, n° 8, p. 472-485, août 2016.

[13] S. Le Jan *et al.*, « Innate immune cell-produced IL-17 sustains inflammation in bullous pemphigoid », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, n° 12, p. 2908-2917, déc. 2014.

[14] J. Plée *et al.*, « Integrating longitudinal serum IL-17 and IL-23 follow-up, along with autoantibodies variation, contributes to predict bullous pemphigoid outcome », *Sci Rep*, vol. 5, p. 18001, 2015.

[15] M. Riani *et al.*, « Bullous pemphigoid outcome is associated with CXCL10-induced matrix metalloproteinase 9 secretion from monocytes and neutrophils but not lymphocytes », *J. Allergy Clin. Immunol.*, sept. 2016.

[16] A. Klopot, G. Baida, P. Bhalla, G. Haegeman, et I. Budunova, « Selective Activator of the Glucocorticoid Receptor Compound A Dissociates Therapeutic and Atrophogenic Effects of Glucocorticoid Receptor Signaling in Skin », *J Cancer Prev*, vol. 20, n° 4, p. 250-259, déc. 2015.

[17] E. Lesovaya, A. Yemelyanov, A. C. Swart, P. Swart, G. Haegeman, et I. Budunova, « Discovery of Compound A--a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity », *Oncotarget*, vol. 6, n° 31, p. 30730-30744, oct. 2015.

[18] L. Vaillant *et al.*, « Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group », *Arch Dermatol*, vol. 134, n° 9, p. 1075-1080, sept. 1998.

[19] J.-W. Tjiu *et al.*, « Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 129, n° 4, p. 1016-1025, avr. 2009.

[20] H. Emonard et W. Hornebeck, « Binding of 92 kDa and 72 kDa progelatinases to insoluble elastin modulates their proteolytic activation », *Biological chemistry*, vol. 378, n° 3-4, p. 265–271, 1997.
[21] N. Wang, H. Liang, et K. Zen, « Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance », *Front Immunol*, vol. 5, p. 614, 2014.
[22] C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, et A. M. Hill, « M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm », *J. Immunol.*, vol. 164, n° 12, p. 6166-6173, juin 2000.
[23] F. O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, et M. Locati, « Macrophage activation and polarization », *Front. Biosci.*, vol. 13, p. 453-461, 2008.
[24] V. Doffoel-Hantz, M. Cogné, M. Drouet, A. Sparsa, J.-M. Bonnetblanc, et C. Bédane, « [Physiopathology of bullous pemphigoid] », *Ann Dermatol Venereol*, vol. 136, n° 10, p. 740-747, 748, oct. 2009.
[25] A. Yabluchanskiy *et al.*, « Myocardial Infarction Superimposed on Aging: MMP-9 Deletion Promotes M2 Macrophage Polarization », *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 71, n° 4, p. 475-483, avr. 2016.
[26] Z. Jiang et L. Zhu, « Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma », *J Asthma Allergy*, vol. 9, p. 101-107, 2016.
[27] R. A. Isidro et C. B. Appleyard, « Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 311, n° 1, p. G59-73, juill. 2016.
[28] E. Lesovaya, A. Yemelyanov, A. C. Swart, P. Swart, G. Haegeman, et I. Budunova, « Discovery of Compound A - a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity », *Oncotarget*, vol. 6, n° 31, p. 30730-30744, oct. 2015.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: **BP serum and BF affected the expression of M1/M2 macrophage markers in THP-1 derived macrophage.** CXCL10 , CD163 and CD206 expressions were analysed by real-time qPCR in THP-1 derived macrophage unstimulated (NS) and stimulated with CTR serum from control subjects, with BP serum and with blister fluid (BF) from patients with BP. The error bars denote the mean ± SEM and two-way ANOVA test was used for statistics. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***$P \leq 0.001$

Figure 2: **BP serum affected the expression of M1/M2 macrophage markers in MDM.** The expression of CXCL10, CD163 and CD206 were analysed by real-time qPCR in monocytes isolated either from control subjects or from patients with BP and differentiated into macrophages (CTR MDM and BP MDM, respectively)) with either serum from control subjects (CTR MDM + CTR serum) or serum from patients with BP (CTR MDM + BP serum and BP MDM + BP serum). The error bars denote the mean ± SEM and two-way ANOVA test was used for statistics. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***$P \leq 0.001$

Figure 3: **BF affected the expression of M1/M2 macrophage markers in BP MDM.** CXCL10, CD163 and CD206 expression was analysed by real-time qPCR in BP MDM stimulated by V1 serum (day 30) and by V5 serum (day 30) in the presence or not of BF. The error bars denote the mean ± SEM and two-way ANOVA test was used for statistics. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***$P \leq 0.001$

Figure 4: **MMP-9, a marker of M2 in THP-1 derived macrophage. A**) MMP-9 activity was measured by gelatin zymography in M0, M1 and M2 THP-1 derived macrophage. **B)** ImageJ

software was used for the quantification of MMP9 activity in M0, M1 and M2. The error bars denote the mean ± SEM and two-way ANOVA test was used for statistics. **C)** MMP-9 expression was analysed by real-time qPCR in in M0, M1 and M2 THP-1 derived macrophage. **D)** MMP-9 expression was analysed by real-time qPCR in THP-1 derived macrophage none stimulated (NS) and stimulated by CTR serum, BP serum and BF. **E)** MMP-9 expression was analysed by real-time qPCR in CTR MDM stimulated by CTR serum or BP serum and BP MDM stimulated by BP serum. **F)** MMP-9 expression was analysed by real-time qPCR in BP MDM stimulated by V1 serum (day 30) and by V5 serum (day 30) in the presence or not of BF. The error bars denote the mean ± SEM and two-way ANOVA test was used for statistics. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***$P \leq 0.001$

Figure 5: **Treatment by MP and CpA changed the expression of M1/M2 macrophage markers associated to BP. A)** MMP-9, CXCL10, CD163 and CD206 expression was analysed by real-time qPCR in THP-1 derived macrophage none stimulated (CTR) and stimulated by BP serum and blister fluid (BF). For each condition 10 µM methylprenisolone (MP) or 10 µM Compound A (CpA) or neither (NS) was added. The error bars denote the mean ± SEM and two-way ANOVA test was used for statistics. **B)** MMP-9, CXCL10, CD163 and CD206 expression was analysed by real-time qPCR in CTR MDM stimulated by CTR serum or BP serum and BP MDM stimulated by BP serum. For each condition 10 µM methylprenisolone (MP) or 10 µM Compound A (CpA) or neither (NS) was added. **C)** MMP-9, CXCL10, CD163 and CD206 expression was analysed by real-time qPCR in BP MDM stimulated by BP serum and BF. For each condition 10 µM methylprenisolone (MP) or 10 µM Compound A (CpA) or neither (NS) was added. The error bars denote the mean ± SEM and two-way ANOVA test was used for statistics. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***$P \leq 0.001$

Figure 1

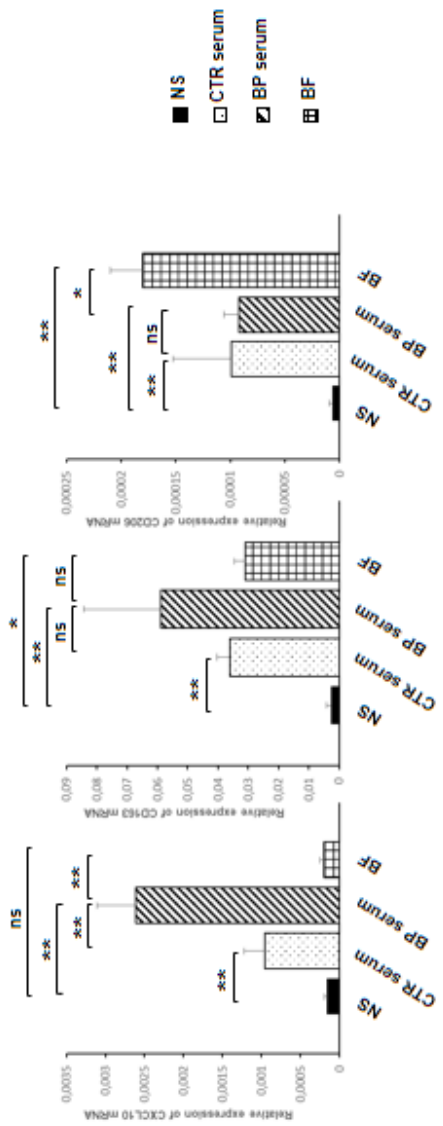

NS
CTR serum
BP serum
BF
Relative expression of CXCL10 mRNA
Relative expression of CD163 mRNA
Relative expression of CD206 mRNA
NS
CTR serum
BP serum
BF
ns
*
**

Figure 2

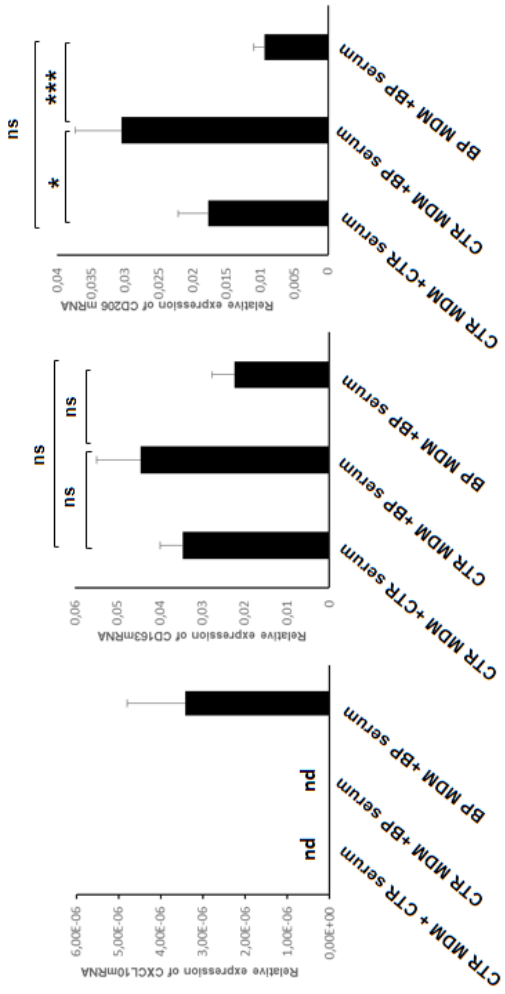

Relative expression of CXCL10mRNA
6,00E-06
5,00E-06
4,00E-06
3,00E-06
2,00E-06
1,00E-06
0,00E+00
nd
nd
CTR MDM + CTR serum
CTR MDM +BP serum
BP MDM +BP serum
Relative expression of CD163mRNA
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
ns
ns
ns
CTR MDM +CTR serum
CTR MDM +BP serum
BP MDM +BP serum
Relative expression of CD206 mRNA
0,04
0,035
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
ns
*
***
CTR MDM +CTR serum
CTR MDM +BP serum
BP MDM +BP serum

Figure 3

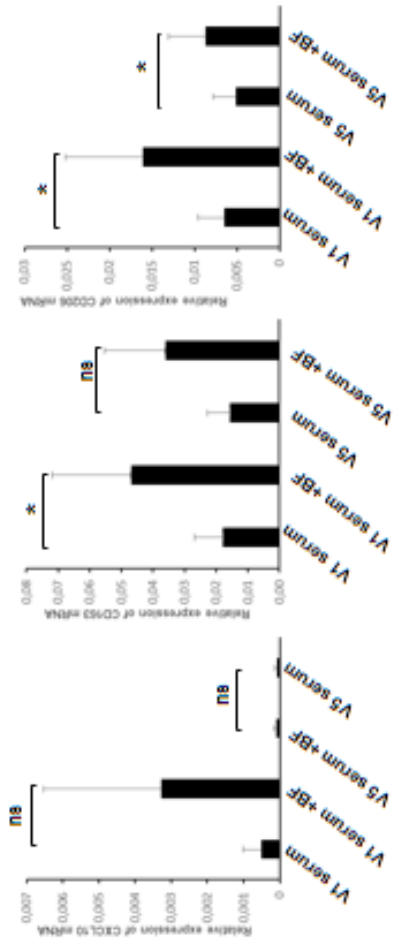

Relative expression of CXCL10 mRNA
0,007
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0
ns
ns
V1 serum
V1 serum +BF
V5 serum +BF
V5 serum
Relative expression of CD163 mRNA
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
*
ns
V1 serum
V1 serum +BF
V5 serum +BF
V5 serum
Relative expression of CD206 mRNA
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
*
*
V1 serum
V1 serum +BF
V5 serum +BF
V5 serum

Figure 4

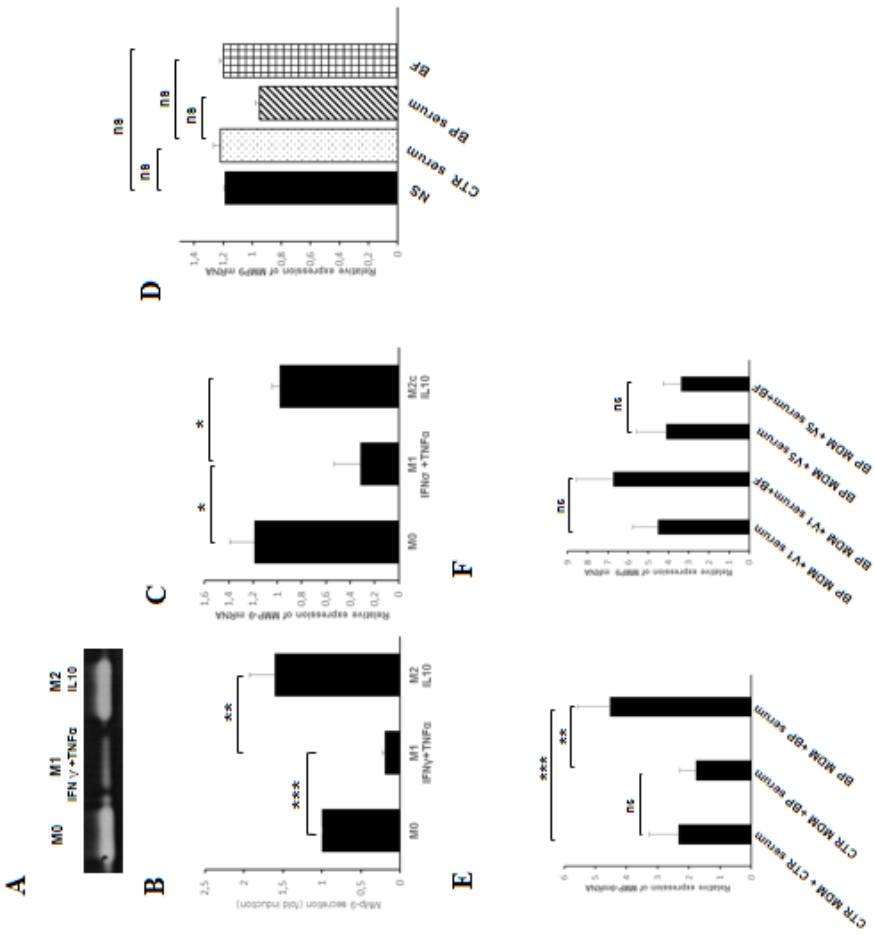
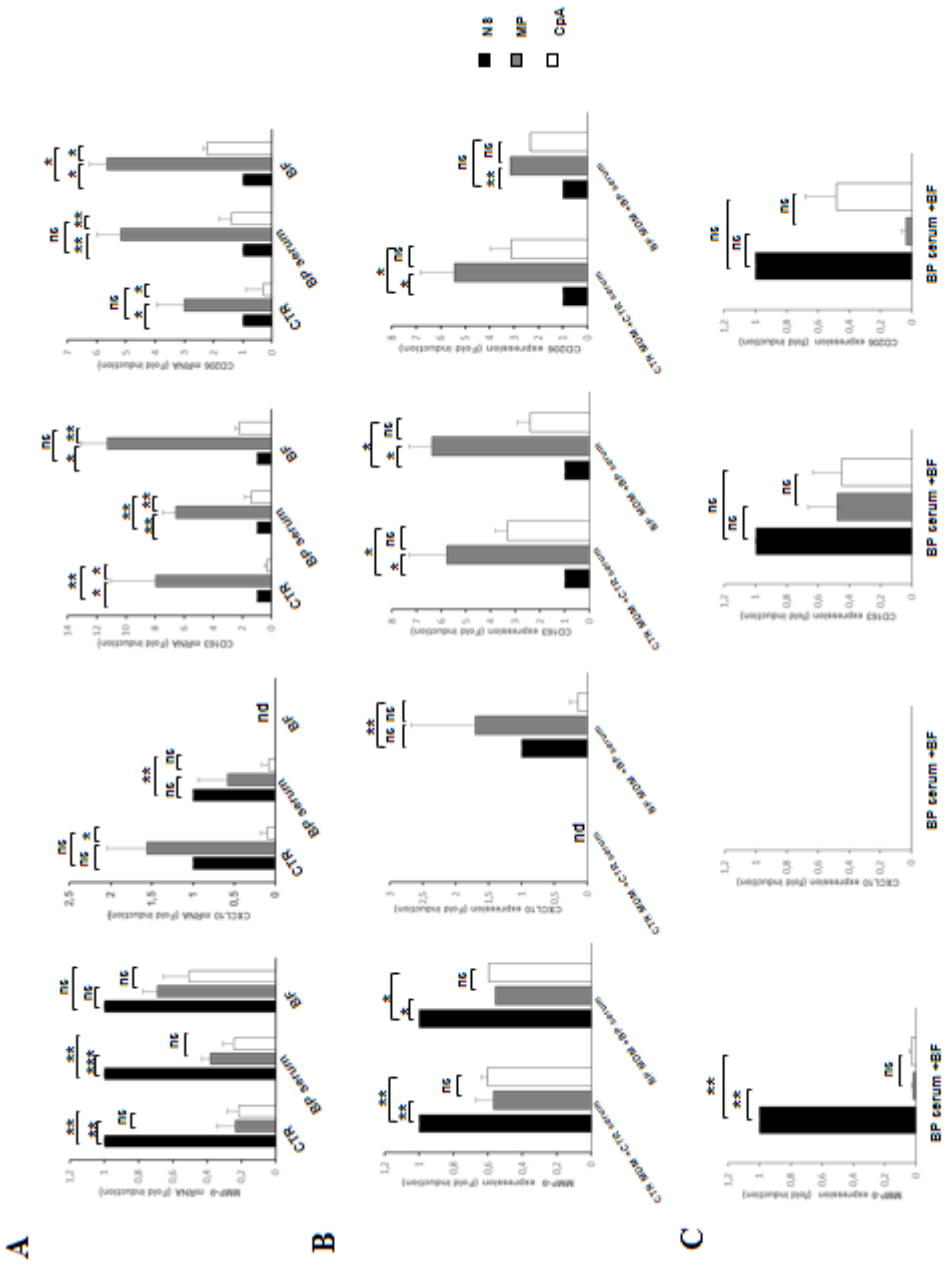

A
M0
M1
IFN γ +TNFα
M2
IL10
B
MMP-9 secretion (fold induction)
M0
M1
IFNγ+TNFα
M2
IL10
C
Relative expression of MMP-9 mRNA
M0
M1
IFNα +TNFα
M2c
IL10
D
Relative expression of MMP9 mRNA
NS
CTR serum
BP serum
BF
E
Relative expression of MMP-9mRNA
CTR MDM + CTR serum
CTR MDM +BP serum
BP MDM +BP serum
F
Relative expression of MMP9 mRNA
BP MDM +V1 serum
BP MDM +V1 serum+BF
BP MDM +V3 serum
BP MDM +V3 serum+BF

Figure 5


A
B
C
N 8
MP
CpA
CTR
BP serum
BF
CTR BDR +CTR serum
BP BDR +BP serum
BP serum +BF
nd
ns

DISCUSSION GENERALE

Depuis quelques années les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de la pemphigoïde bulleuse ont bien avancé notamment grâce aux générations de plusieurs modèles murins de la maladie et aux observations faites sur les patients. Ces données démontrent en particulier l'importance d'une cascade inflammatoire associée à la maladie qui implique plusieurs cytokines dans une suite d'étapes conduisant à l'apparition des signes et symptômes cliniques connues de la maladie, comme l'apparition de bulles. Dans des études récentes, nous avons montré que le suivi de la concentration sérique des cytokines IL-17 et IL-23 permettaient de discriminer les patients PB qui rechutent durant la première année de suivi de ceux qui sont en rémission. Ces études suggèrent que la constitution d'un panel de cytokines associées à l'évolution de la maladie pourrait aider à construire un « inflammascore » comme outil prédictif de la rechute pour les malades PB. Dans cette thèse, nous avons continué le travail commencé par le laboratoire de dermatologie en complétant cette notion d'inflammascore par l'analyse de la variation de la concentration en CXCL10 dans le sérum des malades PB au cours du suivi clinique.

Nos résultats montrent que la chimiokine CXCL10 est fortement exprimée chez les patients atteints de PB, aussi bien dans le sérum que dans le liquide de bulle *(figure1, publication n°1)*. Cette forte production de CXCL10 provient des cellules inflammatoires circulantes ou infiltrant le site lésionnel de la peau des patients, ainsi que les cellules résidentes de la peau comme les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Cette production de CXCL10 peut être due à une stimulation par de l'IFNγ et du TNFα qui sont surexprimés au niveau du site lésionnel dans la PB [128], comme cela a été montré dans d'autres maladies autoimmunes. En effet, il a été montré que l'expression de CXCL10 est augmentée après stimulation des cellules avec ces deux cytokines [67] [66]. Il est intéressant de noter que l'expression de ces 3 molécules, l'IFNγ, le TNFα et CXCL10 est associée à une polarisation des macrophages vers un phénotype de type M1 [115] . Ces données suggèrent que la production de CXCL10 sous l'influence de l'IFNγ et du TNFα au niveau du site lésionnel de la PB pourrait être associée à un mécanisme inflammatoire impliquant les macrophages différenciés en type M1. Par ailleurs, il a été montré dans une étude [124] que l'IL-17, qui est fortement exprimée dans le liquide de bulles [63], induisait l'expression de CXCL10 dans les kératinocytes, suggérant un rôle important de l'IL-17 dans la production de CXCL10 dans le site lésionnel de la peau des patients PB. La présence d'IL-17 crée un milieu proinflammatoire, souvent associé à la présence de l'IL-23, une cytokine produite par les macrophages de polarisation M1. Ces données permettent de proposer un nouveau schéma de production de

CXCL10 dans la PB faisant intervenir plusieurs acteurs. D'une part l'IL-17, qui stimule la production de CXCL10 par les cellules résidentes de la peau, ce qui induit le recrutement des cellules inflammatoires comme les lymphocytes de type Th1, les neutrophiles, mais aussi les macrophages qui produisent du CXCL10 sous une stimulation par l'IFNγ et le TNFα, créant ainsi une boucle d'autoamplification inflammatoire.

Nos résultats montrent que l'expression de CXCL10 peut être augmentée par lui-même et par l'IL-17 dans les monocytes différenciés en macrophages ex vivo en présence de sérum autologue, mais aussi par les lymphocytes isolés de patients *(figure 1-D-F, publication n°1).* En outre, les monocytes dérivés en macrophages issus de patients PB ont une propension plus importante à exprimer CXCL10 que lorsque ces cellules sont issues de donneurs sains *(figure n°2, publication n°2).* Ces résultats suggèrent que les monocytes de patients PB sont initialement activés dans le sang par la présence de molécules inflammatoires dont CXCL10. Ceci supporte l'hypothèse de l'implication des macrophages et de CXCL10 dans une boucle d'amplification auto-inflammatoire qui favorise le recrutement des polynucléaires neutrophiles au site de lésion. Ce mécanisme d'amplification de la réponse inflammatoire via la présence de macrophages est en accord avec l'implication des macrophages dans le mécanisme d'amplification de la réponse inflammatoire induite par la dégranulation des mastocytes suite à la fixation des auto-anticorps et l'activation du complément [113] [111] [129]. De plus, nos résultats montrent que CXCL10 augmente la sécrétion de la MMP-9 dans les monocytes *(figure n°4, publication n°1).* La MMP-9 produite pourrait favoriser la diapédèse des monocytes à l'origine du recrutement des macrophages au site lésionnel. Toutefois, nous avons aussi observé une expression importante des marqueurs M2 des macrophages tels que le CD163 et le CD206 par les monocytes dérivés en macrophage en présence de sérum provenant de malades PB, mais aussi de contrôles sains *(figure n°1 et n°3, publication n°2).* Ceci suggère d'une part que cet effet n'est pas lié à la maladie et d'autre part que les sérums de malades pré-activent plus les macrophages qu'ils ne les orientent.

Le liquide de bulle induit un phénotype anti-inflammatoire de type M2 des macrophages *(figure n°1 et n°3, publication n°2).* Ces données s'opposent avec l'implication des macrophages dans le mécanisme d'auto-amplification décrit ci-dessus. Ce résultat suggère que l'orientation des macrophages est liée à la présence du liquide de bulle et donc à la phase active bulleuse de la maladie. L'orientation des macrophages vers la polarisation M2 par le liquide de bulle est caractérisée par une augmentation de l'expression des récepteurs CD163 et CD206,

ainsi que par une absence d'expression de CXCL10 *(figure n°1 et n°3, publication n°2).* Ce résultat est en accord avec les résultats d'une récente étude montrant l'expression in situ de ces marqueurs de type M2 dans la PB et à moindre degré dans le pemphigus vulgaris [122]. Cette orientation des macrophages vers un profile M2 en présence de liquide de bulle est aussi en accord avec la présence dans ce fluide biologique de complexes immuns pouvant aussi être à l'origine de cette polarisation M2. En conséquence, le mécanisme d'autoamplification décrit ci-dessus et impliquant une expression de CXCL10 par les macrophages serait plutôt applicable lors de la réaction inflammatoire durant la phase pré-bulleuse de la maladie, ou associé à une réaction inflammatoire persistante sous traitement et qui pourrait être à l'origine des rechutes. En effet, nos résultats montrent une augmentation de la concentration sérique de CXCL10 *(figure 1-C, publication n°1)* et d'IL-23 [64] sous traitement chez les malades qui rechutent. En outre, l'IL-23 est exprimée par les macrophages de polarisation M1. Ceci pourrait expliquer en partie l'origine de l'augmentation de cette cytokine soit durant la phase pré-bulleuse ou lors de la survenue de rechute [126] [64].

La polarisation de type M2 observée en présence du LB est associée aux mécanismes anti-inflammatoires bénéfiques lors de la réparation des tissus et de la restauration de l'homéostasie [119]. Cette orientation de type M2 induite par le liquide de bulle est donc en contradiction avec le caractère pro-inflammatoire généralement associé à ce liquide. Ainsi, durant la phase bulleuse, la polarisation des macrophages en réponse au liquide de bulle pourrait représenter un mécanisme de contrôle de la réaction inflammatoire locale. En revanche, les macrophages de type M2 se caractérisent par une forte expression de la MMP-9 *(figure 4-B, publication n°2)* [130] . Cette production de la MMP-9 reste délétère dans le contexte de la maladie, puisqu'elle favorise la dégradation de la matrice extracellulaire, et par conséquent la production de PGP [126]. En effet, notre équipe a démontré précédemment que ce peptide possède des propriétés chimioattractantes pour les neutrophiles [126], créant ainsi une boucle d'amplification de la réaction inflammatoire. Les effets de la polarisation vers un profile M2 des macrophages en présence du liquide de bulle reste donc ambigus, puisqu'ils s'associent d'une part à une réponse anti-inflammatoire et d'autre part à la génération d'une boucle d'amplification de la réponse inflammatoire *via* les produits de dégradation de la matrice extracellulaire qui pourrait prendre le relai de celle induite par CXCL10 lors de la phase prébulleuse de la PB. Sachant que dans des maladies comme l'asthme et l'allergie, un nombre excessif de macrophages de type M2 augmente le recrutement de lymphocytes de type Th2, ainsi que l'infiltration des éosinophiles [121] [131], un tel recrutement de lymphocyte Th2 dans

la PB pourrait favoriser la réponse autoimmune locale qui alimente la réponse inflammatoire locale.

Les effets d'un traitement par le méthylprednisolone sur les propriétés des macrophages sont conditionnés par la présence préalable du liquide de bulle *(figure 5-A/5-C, publication n°2).* Nos résultats suggèrent que lors de la phase pré-bulleuse, en absence de stimulation par le liquide de bulle, la réduction clinique des placards inflammatoires lors d'un traitement par les corticostéroïdes inhibe la sécrétion de la MMP-9 tout en favorisant la polarisation vers un phénotype M2 des macrophages (augmentation de l'expression de CD163 et de CD206). Ce traitement présente donc un double avantage, puisqu'il empêche la formation de la boucle d'amplification induite par la MMP-9 *via* la génération des peptides PGP, tout en favorisant un profile antiinflammatoire des macrophages. Sur le plan clinique, la formation des bulles chez les patients est contrôlée après traitement par corticothérapie à forte dose. Sous l'influence de la méthylprednisolone, les 3 marqueurs de macrophages de type M2, CD163, CD206 et MMP-9 induits par le liquide de bulle sont inhibés *(figure 5-C, publication n°2)*, montrant que les effets de la corticothérapie varient en fonction du degré d'activation des macrophages associé à la stimulation par le liquide de bulle. Cette inhibition globale des marqueurs de différenciation des macrophages correspondrait donc plus à un mécanisme inhibiteur de l'activation des macrophages, de la réaction inflammatoire associée à la PB, et donc de la formation des bulles, plutôt que d'un mécanisme de réorientation des macrophages. Au vu de ces résultats, il est possible d'émettre l'hypothèse que suite à cette inhibition de la réponse inflammatoire et de la phase bulleuse, un traitement par les corticoïdes continue à inhiber l'expression de la MMP-9 tout en favorisant de nouveau les marqueurs de différenciation M2 des macrophages. Un tel mécanisme pourrait ainsi être à l'origine du processus de réparation sans cicatrice observée dans la PB. En effet, il est généralement accepté dans la littérature que la cicatrisation et la régénération des tissus sont sous le contrôle de la polarisation antiinflammatoire de type M2 des macrophages. Toutefois, il a aussi été montré un rôle important de CXCL10 et de son récepteur CXCR3 dans le processus de cicatrisation et dans la régénération tissulaire [73]. En effet, nous avons observé que la concentration de CXCL10 reste non négligeable dans le sérum des malades en rémission malgré un traitement par les corticoïdes durant 2 mois *(figure 1-C, publication n°1).* Des études complémentaires sont donc nécessaires pour définir plus précisément la qualité des macrophages avant et après la phase bulleuse de la maladie lors de

la décroissance du traitement par les corticoïdes, car une multitude de phénotypes intermédiaires entre M1 et M2 ont été décrits pour les macrophages [132] .

Un traitement par le CpA est aussi efficace que celui par la méthylprénisolone dans l'inhibition de la MMP-9 produite par les monocytes et par les macrophages *(figure 6-C, publication n°1) et (figure n°5, publication n°2).* Le composé A inhibe l'activation de plusieurs facteurs de transcription tels que AP-1 impliqués dans l'expression de la MMP-9 par l'inhibition de l'activation de la cascade de signalisation de la PI3K / Akt et ERK1/2 [133], comme observé dans la lignée monocytaire THP-1 *(figure n°6, publication n°1).* Un tel composé pourrait donc être une solution alternative à la corticothérapie au long cours dans les maladies inflammatoires comme la PB. Toutefois, il est intéressant de noter que dans les macrophages dérivés de monocytes de patients PB en présence de sérum *(figure 5-B, publication n°2),* le méthylprednisolone et le CpA ont des effets différents. En effet, le MP inhibe la MMP-9 et induit une orientation M2 tandis que le CpA inhibe la MMP-9, mais son effet sur les marqueurs de différenciation de type M2 reste modéré, voire faible. Des études complémentaires en utilisant ces molécules pourraient donner des informations sur le rôle des macrophages et de leur polarisation dans le processus de réparation tissulaire sans cicatrice. En revanche, en présence de liquide bulle, le spectre d'inhibition du CpA s'élargit pour inhiber tous les marqueurs de polarisation ainsi que la MMP-9, comme observé avec le méthylprednisolone *(figure 5-A/5-C, publication n°2).* Ce résultat supporte l'hypothèse ci-dessus que lors de la phase bulleuse, les macrophages seraient plutôt dans un état d'activation fort, caractérisé par l'expression de molécules en relation avec la pathogénie de la maladie. Ces traitements agiraient donc en 2 temps, tout d'abord une inhibition de l'activation des macrophages, et ensuite une orientation de ces cellules, adaptées ou non aux processus de réparation des tissus endommagés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre étude a décrit les réponses inflammatoires chez les patients atteints de PB, et a montré le rôle important de la chimiokine CXCL10 qui devrait être incluse dans le tableau des molécules inflammatoires constituant « l'inflammascore » comme outil prédictif de l'évolution de la maladie. De plus il serait intéressant dans le futur de déterminer le réseau des chimiokines et des cytokines qui orchestre les mécanismes physiopathologique de l'évolution de la maladie surtout celles liées à la rechute. D'autre part, nous avons montré pour la première fois que la plasticité des macrophages dans la PB est un processus séquentiel qui commence par une préactivation des cellules par les molécules inflammatoires dans le sang durant la phase prébulleuse de la maladie pour se différencier en une polarisation M2 proinflammatoire durant la phase active de la maladie, ce qui montre que la polarisation des macrophages dans la PB est un mécanisme étroitement lié aux caractéristiques cliniques de la maladie et se caractérise par une plasticité qui est influencée par le type, la concentration et le temps d'exposition aux agents stimulant de polarisation [134]. Les mécanismes moléculaires qui régissent cette plasticité lors de la PB, restent cependant mal compris.

Nous avons également montré que seulement les neutrophiles et les monocytes isolés de patients atteints de PB, mais pas leur lymphocytes, répondent à une stimulation par CXCL10 par une augmentation de leur sécrétion en MMP-9 *via* l'activation des voies de signalisation ERK1/2, P38 et PI3K, suggérant que la préactivation des monocytes par des molécules inflammatoires dans le sérum des patients pourrait être cruciale dans le processus physiopathologique de la maladie.. Enfin, nous avons montré l'importance des activateurs sélectifs des récepteurs des glucocorticoïdes, tels que le composé A, qui était aussi efficace que le traitement avec la méthylprénisolone dans l'inhibition de la MMP-9, mais avec des effets distincts sur l'expression des marqueurs phénotypiques de macrophages. Ainsi d'autres investigations sont nécessaires pour savoir si un tel composé pourrait être d'intérêt comme un traitement futur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

[1] G. Marazza *et al.*, « Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study », *Br. J. Dermatol.*, vol. 161, n° 4, p. 861-868, oct. 2009.

[2] K. E. Brick *et al.*, « Incidence and Mortality Rates of Bullous Pemphigoid in Olmsted County, Minnesota, Over 6 Decades », *J Am Acad Dermatol*, vol. 71, n° 1, p. 92-99, juill. 2014.

[3] P. Joly *et al.*, « Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 132, n° 8, p. 1998-2004, août 2012.

[4] P. Joly, « Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris », *BMJ*, vol. 337, n° 7662, p. 123-124, juill. 2008.

[5] M. Jung, W. Kippes, G. Messer, D. Zillikens, et B. Rzany, « Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 41, n° 2 Pt 1, p. 266-268, août 1999.

[6] N. Cordel *et al.*, « Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid », *Dermatology (Basel)*, vol. 215, n° 3, p. 187-191, 2007.

[7] S. Bastuji-Garin *et al.*, « Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, n° 3, p. 637-643, mars 2011.

[8] L. Vaillant *et al.*, « Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group », *Arch Dermatol*, vol. 134, n° 9, p. 1075-1080, sept. 1998.

[9] P. Joly *et al.*, « Clinical criteria for the diagnosis of bullous pemphigoid: a reevaluation according to immunoblot analysis of patient sera », *Dermatology (Basel)*, vol. 208, n° 1, p. 16-20, 2004.

[10] « Bullous pemphigoid ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.pcds.org.uk/clinical-guidance/bullous-pemphigoid1. [Consulté le: 30-mai-2016].

[11] D. F. Murrell *et al.*, « Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 66, n° 3, p. 479-485, mars 2012.

[12] J. R. Person et R. S. Rogers, « Bullous and cicatricial pemphigoid. Clinical, histopathologic, and immunopathologic correlations », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 52, n° 1, p. 54-66, janv. 1977.

[13] P. Courville, I. Kupfer, D. Gilbert, E. Thomine, J. Metayer, et P. Joly, « [Evaluation of histological criteria for bullous pemphigoid. Correlation with antigens recognized by immunoblotting of anti-epidermal autoantibodies] », *Ann Pathol*, vol. 20, n° 6, p. 564-569, déc. 2000.

[14] G. C. Chaidemenos *et al.*, « Value of routine diagnostic criteria of bullous pemphigoid », *Int. J. Dermatol.*, vol. 37, n° 3, p. 206-210, mars 1998.

[15] A. Gary *et al.*, « [Relationship between clinical findings of patients with bullous pemphigoid and antigens recognized by their circulating antibasement membrane zone antibodies] », *Ann Dermatol Venereol*, vol. 131, n° 4, p. 333-337, avr. 2004.

[16] K. B. Yancey, « The pathophysiology of autoimmune blistering diseases », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 4, p. 825-828, avr. 2005.

[17] L. S. Chan, « Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases », *Front. Biosci.*, vol. 2, p. d343-352, 1997.

[18] L. Borradori et A. Sonnenberg, « Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 112, n° 4, p. 411-418, avr. 1999.

[19] M. Amagai *et al.*, « Partial cDNA cloning of the 230-kD mouse bullous pemphigoid antigen by use of a human monoclonal anti-basement membrane zone antibody », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 95, n° 3, p. 252-259, sept. 1990.

[20] Y. Matsuzaki, K. Tamai, A. Kon, D. Sawamura, J. Uitto, et I. Hashimoto, « Keratinocyte responsive element 3: analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene promoter », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 120, n° 2, p. 308-312, févr. 2003.

[21] T. Tanaka, D. A. Parry, V. Klaus-Kovtun, P. M. Steinert, et J. R. Stanley, « Comparison of molecularly cloned bullous pemphigoid antigen to desmoplakin I confirms that they define a new family of cell adhesion junction plaque proteins », *J. Biol. Chem.*, vol. 266, n° 19, p. 12555-12559, juill. 1991.

[22] E. H. Lee, Y. H. Kim, S. Kim, S.-E. Kim, et S.-C. Kim, « Usefulness of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinant BP180 and BP230 for Serodiagnosis and Monitoring Disease Activity of Bullous Pemphigoid », *Ann Dermatol*, vol. 24, n° 1, p. 45-55, févr. 2012.

[23] D. Zillikens, « BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes », *Keio J Med*, vol. 51, n° 1, p. 21-28, mars 2002.

[24] G. J. Giudice, D. J. Emery, et L. A. Diaz, « Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180 », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 99, n° 3, p. 243-250, sept. 1992.

[25] D. Zillikens *et al.*, « Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 109, n° 4, p. 573-579, oct. 1997.

[26] Z. Liu *et al.*, « A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 92, n° 5, p. 2480–2488, nov. 1993.

[27] M. Kasperkiewicz et D. Zillikens, « The pathophysiology of bullous pemphigoid », *Clin Rev Allergy Immunol*, vol. 33, n° 1-2, p. 67-77, oct. 2007.

[28] Z. Liu *et al.*, « The role of complement in experimental bullous pemphigoid », *J. Clin. Invest.*, vol. 95, n° 4, p. 1539-1544, avr. 1995.

[29] Z. Liu, N. Li, L. A. Diaz, M. Shipley, R. M. Senior, et Z. Werb, « Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 4, p. 879-887, avr. 2005.

[30] E. Laffitte et L. Borradori, « [Management of bullous pemphigoid] », *Ann Dermatol Venereol*, vol. 128, n° 5, p. 677-680, mai 2001.

[31] S. Hiroyasu *et al.*, « Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway », *Am. J. Pathol.*, vol. 182, n° 3, p. 828-840, mars 2013.

[32] K. N. Messingham, R. Srikantha, A. M. DeGueme, et J. A. Fairley, « FcR-independent effects of IgE and IgG autoantibodies in bullous pemphigoid », *J. Immunol.*, vol. 187, n° 1, p. 553-560, juill. 2011.

[33] K. N. Messingham, H. M. Holahan, A. S. Frydman, C. Fullenkamp, R. Srikantha, et J. A. Fairley, « Human eosinophils express the high affinity IgE receptor, FcεRI, in bullous pemphigoid », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 9, p. e107725, 2014.

[34] J. A. Fairley, C. T. Burnett, C.-L. Fu, D. L. Larson, M. G. Fleming, et G. J. Giudice, « A pathogenic role for IgE in autoimmunity: bullous pemphigoid IgE reproduces the early phase of lesion development in human skin grafted to nu/nu mice », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, n° 11, p. 2605-2611, nov. 2007.

[35] P. Bernard, C. Bedane, C. Prost, S. Ingen-Housz-Oro, P. Joly, et Centres de référence des maladies bulleuses auto-immunes. Société Française de Dermatologie, « [Bullous pemphigoid. Guidelines for the diagnosis and treatment. Centres de référence des maladies bulleuses auto-immunes. Société Française de Dermatologie] », *Ann Dermatol Venereol*, vol. 138, n° 3, p. 247-251, mars 2011.

[36] P. Joly *et al.*, « A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid », *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, n° 5, p. 321-327, janv. 2002.

[37] P. Bernard *et al.*, « Risk factors for relapse in patients with bullous pemphigoid in clinical remission: a multicenter, prospective, cohort study », *Arch Dermatol*, vol. 145, n° 5, p. 537-542, mai 2009.

[38] Cism. C. de Rouen;, « Centre de référence national sur les maladies bulleuses autoimmunes ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.chu-rouen.fr/crnmba/. [Consulté le: 31-mai-2016].

[39] T. Biedermann, Y. Skabytska, S. Kaesler, et T. Volz, « Regulation of T Cell Immunity in Atopic Dermatitis by Microbes: The Yin and Yang of Cutaneous Inflammation », *Front Immunol*, vol. 6, p. 353, 2015.

[40] R. Medzhitov, « Origin and physiological roles of inflammation », *Nature*, vol. 454, n° 7203, p. 428-435, juill. 2008.
[41] K. Honda et D. R. Littman, « The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease », *Nature*, vol. 535, n° 7610, p. 75-84, juill. 2016.
[42] D. A. Sanchez, J. D. Nosanchuk, et A. J. Friedman, « The skin microbiome: is there a role in the pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis? », *J Drugs Dermatol*, vol. 14, n° 2, p. 127-130, févr. 2015.
[43] R. Medzhitov et C. A. Janeway, « Innate immunity: impact on the adaptive immune response », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 9, n° 1, p. 4-9, févr. 1997.
[44] S. E. Turvey et T. R. Hawn, « Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections », *Clin. Immunol.*, vol. 120, n° 1, p. 1-9, juill. 2006.
[45] A. T. Dinh-Xuan et T. V. Nguyen, « [Mechanisms of inflammation of the respiratory mucosa] », *Presse Med*, vol. 31 Spec No 1, p. HS3-6, sept. 2002.
[46] D. Okin et R. Medzhitov, « Evolution of inflammatory diseases », *Curr. Biol.*, vol. 22, n° 17, p. R733-740, sept. 2012.
[47] A. Lo Schiavo, E. Ruocco, G. Brancaccio, S. Caccavale, V. Ruocco, et R. Wolf, « Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies », *Clin. Dermatol.*, vol. 31, n° 4, p. 391-399, août 2013.
[48] R. Chen *et al.*, « Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation », *J. Immunol.*, vol. 169, n° 7, p. 3987-3992, oct. 2002.
[49] « Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate1.inist.fr/pubmed/?term=Iwata+Y%2C+Komura+K%2C+Koder a+M%2C+et+al.+Correlation+of+IgE+autoantibody+to+BP180+with+a+severe+form+of+bullous +pemphigoid.+Arch+Dermatol+2008%3B144%3A41-8. [Consulté le: 18-juin-2016].
[50] E. Schmidt, B. Bastian, R. Dummer, H. P. Tony, E. B. Bröcker, et D. Zillikens, « Detection of elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid », *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 288, n° 7, p. 353-357, juin 1996.
[51] Y. Takiguchi, O. Kamiyama, E. Saito, S. Nagao, F. Kaneko, et T. Minagawa, « Cell-mediated immune reaction in the mechanism of blister formation in bullous pemphigoid », *Dermatologica*, vol. 179 Suppl 1, p. 137, 1989.
[52] L. Leighty, N. Li, L. A. Diaz, et Z. Liu, « Experimental models for the autoimmune and inflammatory blistering disease, Bullous pemphigoid », *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 299, n° 9, p. 417-422, nov. 2007.
[53] C. F. Nathan, « Secretory products of macrophages », *J. Clin. Invest.*, vol. 79, n° 2, p. 319-326, févr. 1987.
[54] Z. Liu *et al.*, « A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid », *J. Clin. Invest.*, vol. 105, n° 1, p. 113-123, janv. 2000.
[55] J. W. Pollard, « Trophic macrophages in development and disease », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, n° 4, p. 259-270, avr. 2009.
[56] T. Echigo, M. Hasegawa, Y. Shimada, M. Inaoki, K. Takehara, et S. Sato, « Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases », *Archives of Dermatological Research*, vol. 298, n° 1, p. 38–45, avr. 2006.
[57] C. Feliciani, P. Toto, S. Mohammad Pour, G. Coscione, P. Amerio, et P. Amerio, « A Th2-like cytokine response is involved in bullous pemphigoid. the role of IL-4 and IL-5 in the pathogenesis of the disease », *Int J Immunopathol Pharmacol*, vol. 12, n° 2, p. 55-61, août 1999.
[58] S. Yasukawa *et al.*, « Bullous pemphigoid followed by pustular psoriasis showing Th1, Th2, Treg and Th17 immunological changes », *European journal of dermatology: EJD*, vol. 19, n° 1, p. 69–71, févr. 2009.
[59] S. Toosi et J.-C. Bystryn, « Potential role of interleukin-17 in the pathogenesis of bullous pemphigoid », *Med. Hypotheses*, vol. 74, n° 4, p. 727-728, avr. 2010.

[60] M. Arakawa *et al.*, « Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid », *Exp. Dermatol.*, vol. 20, n° 12, p. 1022-1024, déc. 2011.
[61] E. Schmidt *et al.*, « Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 115, n° 5, p. 842-848, nov. 2000.
[62] L. D'Auria, P. C. Fei, et F. Ameglio, « Cytokines and bullous pemphigoid. », *European Cytokine Network*, vol. 10, n° 2, p. 123–34, juill. 1999.
[63] S. Le Jan *et al.*, « Innate immune cell-produced IL-17 sustains inflammation in bullous pemphigoid », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, n° 12, p. 2908-2917, déc. 2014.
[64] J. Plée *et al.*, « Integrating longitudinal serum IL-17 and IL-23 follow-up, along with autoantibodies variation, contributes to predict bullous pemphigoid outcome », *Sci Rep*, vol. 5, p. 18001, 2015.
[65] H. Nakashima *et al.*, « Serum chemokine profile in patients with bullous pemphigoid », *Br. J. Dermatol.*, vol. 156, n° 3, p. 454-459, mars 2007.
[66] A. Antonelli, S. M. Ferrari, D. Giuggioli, E. Ferrannini, C. Ferri, et P. Fallahi, « Chemokine (C–X–C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases », *Autoimmunity Reviews*, nov. 2013.
[67] E. Y. Lee, Z.-H. Lee, et Y. W. Song, « CXCL10 and autoimmune diseases », *Autoimmun Rev*, vol. 8, n° 5, p. 379-383, mars 2009.
[68] S. Lacotte, S. Brun, S. Muller, et H. Dumortier, « CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1173, n° 1, p. 310–317, sept. 2009.
[69] Z. Liu *et al.*, « Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid », *J. Exp. Med.*, vol. 188, n° 3, p. 475-482, août 1998.
[70] S. Verraes, W. Hornebeck, M. Polette, L. Borradori, et P. Bernard, « Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 117, n° 5, p. 1091-1096, nov. 2001.
[71] L. Lin *et al.*, « Neutrophil elastase cleaves the murine hemidesmosomal protein BP180/type XVII collagen and generates degradation products that modulate experimental bullous pemphigoid », *Matrix Biol.*, vol. 31, n° 1, p. 38-44, janv. 2012.
[72] M. Baggiolini, B. Dewald, et B. Moser, « Human chemokines: an update », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, p. 675-705, 1997.
[73] A. C. Huen et A. Wells, « The Beginning of the End: CXCR3 Signaling in Late-Stage Wound Healing », *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 1, n° 6, p. 244-248, déc. 2012.
[74] F. Antonicelli et P. Bernard, « CXCL10 (chemokine (C-X-C motif) ligand 10) », *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, p. 16 (11): 782-788, 2012.
[75] R. Vazirinejad, Z. Ahmadi, M. Kazemi Arababadi, G. Hassanshahi, et D. Kennedy, « The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis », *Neuroimmunomodulation*, vol. 21, n° 6, p. 322-330, 2014.
[76] V. Booth, D. W. Keizer, M. B. Kamphuis, I. Clark-Lewis, et B. D. Sykes, « The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions », *Biochemistry*, vol. 41, n° 33, p. 10418-10425, août 2002.
[77] R. Mehla, « Chemokine Deregulation in HIV Infection: Role of Interferon Gamma Induced Th1-Chemokine Signaling », *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, vol. 04, n° 01, 2013.
[78] D. Wu, G. J. LaRosa, et M. I. Simon, « G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8 », *Science*, vol. 261, n° 5117, p. 101-103, juill. 1993.
[79] C. McKimmie et D. Michlmayr, « Role of CXCL10 in central nervous system inflammation », *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, p. 1, févr. 2014.
[80] C. Billottet, C. Quemener, et A. Bikfalvi, « CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1836, n° 2, p. 287-295, déc. 2013.
[81] K. Van Raemdonck, P. E. Van den Steen, S. Liekens, J. Van Damme, et S. Struyf, « CXCR3 ligands in disease and therapy », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 26, n° 3, p. 311-327, juin 2015.

[82] A. K. Singh *et al.*, « Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12 », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 24, n° 1, p. 41-49, févr. 2013.
[83] S. Qin *et al.*, « The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions », *J. Clin. Invest.*, vol. 101, n° 4, p. 746-754, févr. 1998.
[84] L. Nissinen et V.-M. Kähäri, « Matrix metalloproteinases in inflammation », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1840, n° 8, p. 2571-2580, août 2014.
[85] G. I. Murray, « Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules », *J. Pathol.*, vol. 195, n° 2, p. 135-137, sept. 2001.
[86] J.-L. Beaudeux, P. Giral, E. Bruckert, M.-J. Foglietti, et M. J. Chapman, « Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives », *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 42, n° 2, p. 121-131, févr. 2004.
[87] T. H. Vu et Z. Werb, « Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology », *Genes Dev.*, vol. 14, n° 17, p. 2123-2133, sept. 2000.
[88] A. R. Farina et A. R. Mackay, « Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression », *Cancers (Basel)*, vol. 6, n° 1, p. 240-296, 2014.
[89] H. Nagase, R. Visse, et G. Murphy, « Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs », *Cardiovasc. Res.*, vol. 69, n° 3, p. 562-573, févr. 2006.
[90] S. M. McCarty, C. A. Cochrane, P. D. Clegg, et S. L. Percival, « The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: A focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing: Host and bacterial proteases in wound healing », *Wound Repair and Regeneration*, vol. 20, n° 2, p. 125-136, mars 2012.
[91] C. A. Reichel *et al.*, « Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 83, n° 4, p. 864-874, avr. 2008.
[92] B. S. Weeks, H. W. Schnaper, M. Handy, E. Holloway, et H. K. Kleinman, « Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B) », *J. Cell. Physiol.*, vol. 157, n° 3, p. 644-649, déc. 1993.
[93] H. G. Welgus *et al.*, « Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development », *J. Clin. Invest.*, vol. 86, n° 5, p. 1496-1502, nov. 1990.
[94] I. Ohno *et al.*, « Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 16, n° 3, p. 212-219, mars 1997.
[95] N. Kanbe, A. Tanaka, M. Kanbe, A. Itakura, M. Kurosawa, et H. Matsuda, « Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9 », *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, n° 8, p. 2645-2649, août 1999.
[96] P. Albertsson *et al.*, « Matrix metalloproteinases of human NK cells », *In Vivo*, vol. 14, n° 1, p. 269-276, févr. 2000.
[97] E. J. Bartholomé *et al.*, « Human monocyte-derived dendritic cells produce bioactive gelatinase B: inhibition by IFN-beta », *J. Interferon Cytokine Res.*, vol. 21, n° 7, p. 495-501, juill. 2001.
[98] H. Zhou, J. Wu, T. Wang, X. Zhang, et D. Liu, « CXCL10/CXCR3 axis promotes the invasion of gastric cancer via PI3K/AKT pathway-dependent MMPs production », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 82, p. 479-488, août 2016.
[99] A. Zipin-Roitman *et al.*, « CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 7, p. 3396-3405, avr. 2007.
[100] H. Denney, M. R. Clench, et M. N. Woodroofe, « Cleavage of chemokines CCL2 and CXCL10 by matrix metalloproteinases-2 and -9: implications for chemotaxis », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 382, n° 2, p. 341-347, mai 2009.
[101] H. A. Denney, « Enzymatic Cleavage of Chemokines CCL2 and CXCL10 : Implications for Multiple Sclerosis Pathogenesis », Ph.D., Sheffield Hallam University, 2008.
[102] X. C. Fan et J. A. Steitz, « Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs », *EMBO J.*, vol. 17, n° 12, p. 3448-3460, juin 1998.

[103] P. E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, et G. Opdenakker, « Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) », *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 37, n° 6, p. 375-536, déc. 2002.
[104] P. Michaluk et L. Kaczmarek, « Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction », *Cell Death Differ.*, vol. 14, n° 7, p. 1255-1258, juill. 2007.
[105] H. Emonard, G. Bellon, P. de Diesbach, M. Mettlen, W. Hornebeck, et P. J. Courtoy, « Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an "old friend" », *Biochimie*, vol. 87, n° 3-4, p. 369-376, avr. 2005.
[106] Z. Liu, N. Li, L. A. Diaz, M. Shipley, R. M. Senior, et Z. Werb, « Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease », *J Clin Invest*, vol. 115, n° 4, p. 879-887, avr. 2005.
[107] D. M. Mosser et J. P. Edwards, « Exploring the full spectrum of macrophage activation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n° 12, p. 958-969, déc. 2008.
[108] F. Ginhoux et S. Jung, « Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, n° 6, p. 392-404, juin 2014.
[109] F. Ginhoux *et al.*, « Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages », *Science*, vol. 330, n° 6005, p. 841-845, nov. 2010.
[110] F. Ginhoux et M. Guilliams, « Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis », *Immunity*, vol. 44, n° 3, p. 439-449, mars 2016.
[111] F. O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, et M. Locati, « Macrophage activation and polarization », *Front. Biosci.*, vol. 13, p. 453-461, 2008.
[112] I. Striz, E. Brabcova, L. Kolesar, et A. Sekerkova, « Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy », *Clin. Sci.*, vol. 126, n° 9, p. 593-612, mai 2014.
[113] C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, et A. M. Hill, « M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm », *J. Immunol.*, vol. 164, n° 12, p. 6166-6173, juin 2000.
[114] D. M. Mosser, « The many faces of macrophage activation », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 73, n° 2, p. 209-212, févr. 2003.
[115] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, et M. Locati, « The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization », *Trends in Immunology*, vol. 25, n° 12, p. 677-686, déc. 2004.
[116] D. Duluc *et al.*, « Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells », *Blood*, vol. 110, n° 13, p. 4319-4330, déc. 2007.
[117] C. J. Ferrante et S. J. Leibovich, « Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing », *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 1, n° 1, p. 10-16, févr. 2012.
[118] G. Liu et H. Yang, « Modulation of macrophage activation and programming in immunity », *J. Cell. Physiol.*, vol. 228, n° 3, p. 502-512, mars 2013.
[119] S. Gordon, « Alternative activation of macrophages », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, n° 1, p. 23-35, janv. 2003.
[120] A. Sica, M. Erreni, P. Allavena, et C. Porta, « Macrophage polarization in pathology », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, n° 21, p. 4111-4126, nov. 2015.
[121] Y.-C. Liu, X.-B. Zou, Y.-F. Chai, et Y.-M. Yao, « Macrophage polarization in inflammatory diseases », *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 10, n° 5, p. 520-529, 2014.
[122] S. Furudate, T. Fujimura, Y. Kambayashi, A. Kakizaki, et S. Aiba, « Comparison of CD163+ CD206+ M2 macrophages in the lesional skin of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris: the possible pathogenesis of bullous pemphigoid », *Dermatology (Basel)*, vol. 229, n° 4, p. 369-378, 2014.
[123] J. H. Peters *et al.*, « Co-culture of healthy human keratinocytes and T-cells promotes keratinocyte chemokine production and RORγt-positive IL-17 producing T-cell populations », *J. Dermatol. Sci.*, vol. 69, n° 1, p. 44-53, janv. 2013.
[124] C. Koga, K. Kabashima, N. Shiraishi, M. Kobayashi, et Y. Tokura, « Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 128, n° 11, p. 2625-2630, nov. 2008.

[125] A. Dey, J. Allen, et P. A. Hankey-Giblin, « Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages », *Front Immunol*, vol. 5, p. 683, 2014.
[126] S. Le Jan *et al.*, « Innate immune cell-produced IL-17 sustains inflammation in bullous pemphigoid », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, n° 12, p. 2908-2917, déc. 2014.
[127] M. Riani *et al.*, « Bullous pemphigoid outcome is associated with CXCL10-induced matrix metalloproteinase 9 secretion from monocytes and neutrophils but not lymphocytes », *J. Allergy Clin. Immunol.*, sept. 2016.
[128] H. Takematsu, H. Ohta, et H. Tagami, « Determination of tumor necrosis factor in blister fluids of bullous pemphigoid », *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 283, n° 2, p. 131-132, 1991.
[129] V. Doffoel-Hantz, M. Cogné, M. Drouet, A. Sparsa, J.-M. Bonnetblanc, et C. Bédane, « [Physiopathology of bullous pemphigoid] », *Ann Dermatol Venereol*, vol. 136, n° 10, p. 740-747, 748, oct. 2009.
[130] E. Zajac *et al.*, « Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9 », *Blood*, vol. 122, n° 25, p. 4054-4067, déc. 2013.
[131] Z. Jiang et L. Zhu, « Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma », *J Asthma Allergy*, vol. 9, p. 101-107, 2016.
[132] L. Chávez-Galán, M. L. Olleros, D. Vesin, et I. Garcia, « Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages », *Front Immunol*, vol. 6, p. 263, 2015.
[133] A. Yemelyanov, J. Czwornog, L. Gera, S. Joshi, R. T. Chatterton, et I. Budunova, « Novel steroid receptor phyto-modulator compound a inhibits growth and survival of prostate cancer cells », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 12, p. 4763-4773, juin 2008.
[134] L. Cassetta, E. Cassol, et G. Poli, « Macrophage polarization in health and disease », *ScientificWorldJournal*, vol. 11, p. 2391-2402, 2011.

Rôle de la chimiokine CXCL10 dans la réaction inflammatoire associée à l'autoimmunité : exemple de la pemphigoïde bulleuse

La pemphigoïde bulleuse (PB) est la plus fréquente et la plus grave des dermatoses bulleuses auto-immunes caractérisée par une cascade inflammatoire impliquant plusieurs cytokines et cellules inflammatoires, avec la libération de protéases (MMP-9, élastase) conduisant à la formation de la bulle. L'objectif de cette étude est de caractériser cette cascade inflammatoire en analysant la contribution de la chimiokine CXCL10 et des cellules inflammatoires comme les macrophages dans le mécanisme physiopathologique associé à la maladie. Nos résultats ont montré que CXCL10 est présent à des taux importants dans le sérum des patients et dans le liquide de bulle, de plus cette chimiokine reste fortement présente dans le sérum des patients qui rechutent. D'autre part nous avons montré pour la première fois que l'orientation des macrophages dans la PB est contrôlée dans un premier temps par les sérums de patients, qui préactivent les macrophages, puis par le liquide de bulle qui les différencient vers une polarisation M2. Nous avons également montré que seulement les neutrophiles et les monocytes isolés de patients atteints de PB, mais pas leur lymphocytes, répondaient à une stimulation par CXCL10 par une augmentation de leur sécrétion en MMP-9 via l'activation des voies de signalisation ERK1/2, P38 et PI3K. Cette expression de la MMP-9 a été associée à une polarisation de type M2 dans les macrophages issus de monocytes de patients. Enfin, nous avons montré l'importance des activateurs sélectifs des récepteurs des glucocorticoïdes, tels que le composé A, qui était aussi efficace que le traitement avec la méthylprednisolone dans l'inhibition de la MMP-9, mais avec des effets distincts sur l'expression des marqueurs phénotypiques de macrophages.

Mots-clés: pemphigoïde bulleuse, autoimmunité, inflammation, CXCL10, MMP-9, polarisation des macrophages, composé A

Role of the chemokine CXCL10 in the inflammatory response associated with autoimmunity: example of bullous pemphigoid

Bullous pemphigoid (BP) is the most common and serious autoimmune bullous dermatosis characterized by inflammatory cascade involving many cytokines and inflammatory cells, with the release of proteases (MMP-9, HLE) leading to the formation of the blister. The objective of this study is to characterize the inflammatory cascade by analyzing the contribution of the CXCL10 chemokine and inflammatory cells such as macrophages in the pathophysiology associated with the disease. Our results showed that CXCL10 is present at significant levels in the serum of patients and in the blister fluid, this chemokine remains strongly present in the serum of patients who relapse. On the other hand we have shown for the first time that macrophages polarization in BP is controlled by the sera of patients, which activate macrophages, and then blister fluid differentiate macrophages in an M2 polarization. We also showed that only neutrophils and monocytes isolated from patients, but not the lymphocytes responding to stimulation by CXCL10 by an increase in secretion of MMP-9 via the activation of signaling pathways ERK1 / 2, P38 and PI3K. This expression of MMP-9 has been associated with an M2 macrophages polarization derived from monocytes of patients. Finally, we have demonstrated the importance of selective glucocorticoid receptor activators, such as Compound A, which was as effective as treatment with methylprednisolone in inhibiting MMP-9, but with distinct effects on the expression of phenotypic markers of macrophages.

Keys words : Bullous pemphigoid, autoimmunity, inflammation, CXCL10, MMP-9, macrophage polarization, Compound A

Discipline : ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Spécialité : Immunologie

Université de Reims Champagne-Ardenne
Laboratoire de dermatologie, EA-7319, Derm-I-C
Faculté de Médecine, 51 rue Cognaq Jay, 51100 REIMS