

ABREVIATIONS

Dans l'ordre d'apparition dans le texte :

PB : Pemphigoïde Bulleuse

25OHD : 25-hydroxyvitamine D

VDR : Récepteurs stéroïdes à la Vitamine D

BPAG1 : Bullous Pemphigoid Antigen 1

BPAG2 : Bullous Pemphigoid Antigen 2

HLA : Human Leucocyte Antigen

IL: Interleukine

IFN- α : Interferon alpha

UVB : Ultraviolets B

1,25OHD =1,25 dihydroxyvitamine D

PTH = Parathormone

SXR = Steroid and Xenobiotic Receptor

M-DC = Cellules Dendritiques Myéloïdes

CMH= Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Foxp3 = Forkhead box protein 3

SEP = Sclérose en plaque

SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

ECLAM = European Consensus Lupus Activity Measurement

IMC = Indice de Masse Corporelle

S-MMSE = Short Mini-Mental State Examination

IADL = Instrumental Activities of Daily Living

ET = écart-types

OR = Odds Ratios

IC 95% = Intervalle de Confiance 95%

LT = Lymphocytes T

PLAN

I. Introduction

II. La pemphigoïde bulleuse

2.1 Epidémiologie

2.2 Physiopathologie : cible antigénique des autoanticorps

2.2.1 Antigène BPAG1 (bullous pemphigoid antigen 1) ou BP230

2.2.2 Antigène BPAG2 (bullous pemphigoid antigen 2) ou BP180

2.3 Critères diagnostiques

2.3.1 Critères cliniques

2.3.2 Critères histologiques

2.3.3 Critères immunologiques

2.4 Facteurs de risque

2.4.1 L'âge

2.4.2 Pathologies neurologiques

2.4.3 Médicaments

2.4.4 Association à des maladies auto-immunes

2.5. Pemphigoïde bulleuse et auto-immunité

2.5.1 La réponse immune à médiation humorale

2.5.2 La réponse immune à médiation cellulaire

2.6 Traitement de la pemphigoïde bulleuse

III. Vitamine D

3.1 Métabolisme et mode d'action de la vitamine D

3.2 Mode d'action

3.3 Le statut vitaminique D

3.4 Action de la vitamine D sur les voies immunitaires

3.5 Vitamine D et auto-immunité

IV. Hypothèse

V. Objectifs

5.1 Objectif primaire

5.2 Objectif secondaire

VI. Matériels et méthodes

6.1 Participants

6.1.1 Critères d'inclusion

6.1.2 Critères de non inclusion

6.1.3 Méthode d'appariement

6.2 Pemphigoïde bulleuse

6.2.1 Méthode diagnostique

6.2.2 Evaluation de la sévérité

6.3 Concentration sérique de 25 hydroxyvitamine D

6.4 Potentiels facteurs de confusion

6.5 Analyse statistique

6.5 Approbation du protocole et consentements

VII. Résultats

7.1 Résultats principaux

7.2 Analyse complémentaire post-hoc

VIII. Discussion

IX. Conclusion

X. Références bibliographiques

XI. Table des matières

XII. Annexe

I. Introduction

La pemphigoïde bulleuse (PB) est la plus fréquente des dermatoses bulleuses auto-immunes de l'adulte. Elle atteint avec prédilection les sujets âgés, avec un risque multiplié par 300 de 60 à 90 ans (1). Elle est caractérisée cliniquement par un prurit, des bulles tendues à contenu séreux reposant sur des placards urticariens ou eczématiformes. Le pronostic de la PB est sévère avec une mortalité allant de 31 à 41% (2-6) la première année de traitement, très supérieure à celle attendue dans la population générale du même âge. En raison de ce taux élevé de mortalité (6), de son incidence annuelle estimée à environ 20 nouveaux cas par an par millions d'habitants (7,8), et de la coexistence de troubles neurologiques et cognitifs (9-11), la PB constitue un véritable problème de santé publique justifiant une stratégie de prévention et une prise en charge précoce. Cependant, une telle approche exige de détecter le plus précocement possible les facteurs protecteurs ou favorisants la survenue d'une PB, justifiant de comprendre la physiopathologie de cette maladie. Des progrès importants ont été réalisés en ce sens, néanmoins l'ensemble des mécanismes auto-immuns incriminés reste encore mal élucidé.

Tout comme la PB, la prévalence de l'hypovitaminose D augmente avec l'âge (de 60% à 60 ans à 95% à 90 ans) (12) et a été associée à la survenue plus fréquente de troubles neurologiques (13) y compris cognitifs (14). La vitamine D, hormone sécostéroïde (13-16), est souvent cantonnée à son rôle sur le métabolisme phosphocalcique et osseux. Pourtant, depuis ces dix dernières années, une littérature exponentielle en terme de volume d'articles publiés traite de ses effets extra-osseux. C'est ainsi que le rôle important de la vitamine D dans la physiologie du système immunitaire, où elle agit à plusieurs niveaux afin de maintenir la tolérance au soi, a pu être mis en évidence.

De nombreuses études expérimentales, épidémiologiques et cliniques ont montré le rôle potentiel de la vitamine D dans l'apparition et la pérennisation de certaines maladies auto-immunes comme le lupus systémique, ou la sclérose en plaques (15,16). Dans ses études, deux types de relation ont pu être mis en évidence entre le taux sérique de 25 hydroxyvitamine D (25OHD) et les maladie auto-immunes : i) la plus connue et classique est qu'un taux bas est associé le plus souvent à la survenue de la maladie ii) mais aussi un taux élevé de vitamine D a été associé à une amélioration clinique, voir à une réduction du risque de survenue de la maladie.

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que la vitamine D peut jouer un rôle dans la physiopathologie de la PB chez la personne âgée, et notamment que des taux bas peuvent être associés plus souvent à la survenue de la maladie et sa sévérité.

Notre objectif principal était donc de déterminer si, chez la personne âgée hospitalisée, une hypovitaminose D était plus fréquente dans une population de patients atteints de PB comparativement à une population de patients témoins. Notre objectif secondaire était de rechercher s'il existait, chez les patients porteurs d'une PB, une relation entre la sévérité de la maladie et les concentrations sériques de 25OHD.

II. La pemphigoïde bulleuse

2.1 Epidémiologie

La PB est une maladie bulleuse fréquente qui représente 70% des maladies auto-immunes sous épidermiques. Elle touche plus fréquemment les personnes âgées de plus de 70 ans, souvent atteintes de maladies neurologiques ou neuropsychiques (9 - 11). L'âge moyen des patients se situe autour de 80 ans. Quatre cent à 500 nouveaux cas sont diagnostiqués tous les ans en France ; son taux d'incidence a triplé en 15 ans passant de $7 \cdot 10^6$ habitants/an pendant la période 1984-1992 à $21.7 \cdot 10^6$ habitants/an pendant la période 2000-2005 (7,17). Le pronostic de PB est sombre avec des taux de mortalité très variables la première année en fonction des études allant de 31 à 41% (2-6).

2.2 Physiopathologie : cible antigénique des autoanticorps

Les maladies bulleuses auto-immunes sous épidermiques représentent un groupe de dermatoses acquises du à la production d'auto anticorps se fixant sur les protéines de structure qui assurent la cohésion dermo-épidermique. Sur le plan clinique, la PB est caractérisée par l'apparition de bulles et histologiquement par un clivage sous-épidermique. Sur le plan immunologique, elle se caractérise par l'existence de dépôts d'anticorps anti-membrane basale contre deux antigènes cibles, détectables en immunofluorescence directe et par la présence inconstante d'auto-anticorps circulants dirigés contre les déterminants antigéniques de la membrane basale, détectés en immunofluorescence indirecte. Dans la PB, les auto-anticorps circulants dans le sérum des patients sont dirigés contre deux antigènes cibles qui sont des protéines de structures essentielles de l'hémidesmosome responsable de l'interaction

entre les kératinocytes, à leur pôle basal, et la membrane basale au niveau de la jonction dermo-épidermique (Figure 1).

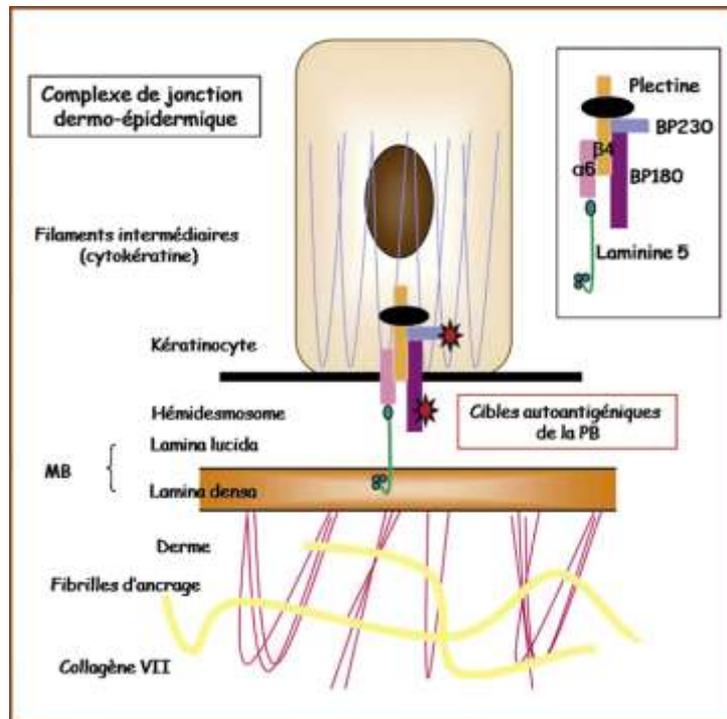


Figure 1 : Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique (d'après V. Doffoel-Hantz (18))

2.2.1 Antigène BPAG1 (bullous pemphigoid antigen 1) ou BP230

Le premier antigène, BPAG1 (bullous pemphigoid antigen 1) ou BP230, est considéré comme l'antigène majeur de la PB. D'un poids moléculaire de 230 KDa, il est reconnu en immunotransfert par près de 70% des sérums de malades atteints de PB (19). Il s'agit d'une protéine de structure située dans la partie interne de l'hémidesmosome. La molécule est formée de deux domaines globulaires séparés par un domaine α -hélicoïdal. Cette protéine est strictement intracellulaire. Cet antigène appartient à la famille des plakines, protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette, et permet l'ancrage des filaments

intermédiaires de kératine à la membrane plasmique du kératinocyte (Figure 1).

2.2.2 Antigène BPAG2 (bullous pemphigoid antigen 2) ou BP180

D'un poids moléculaire de 180 KDa, BPAG2 est une glycoprotéine transmembranaire de l'hémidesmosome. Cet antigène est reconnu en immunotransfert par 20 à 50% des sérums de malades atteints de PB, parfois en association avec l'antigène BPAG1 (19). C'est une protéine transmembranaire avec une succession de domaines collagéniques et non collagéniques. Son extrémité N-terminale intracytoplasmique se situe dans l'hémidesmosome, alors que l'extrémité C-terminale se situe dans la partie inférieure de la lamina lucida, et participe à la formation des filaments d'ancrage qui relient les hémidesmosomes à la lamina densa (Figure 1). Le domaine immunogénique dominant reconnu par le sérum des malades atteints de PB est adjacent à la membrane plasmique des hémidesmosomes – domaine NC16A – constitué de 16 acides aminés. Cet épitope est reconnu par la majorité des sérums de malades atteints de PB, mais aussi par les sérums de patients atteints de pemphigoïde cicatricielle et de pemphigoïde gravidis.

D'autres épitopes (MCW-0, 2, 3, 4 et 5), localisés dans un peptide de 45 acides aminés dans la région N-terminale de NC16A ont été identifiés par la suite, suggérant que la région NC16A contiendrait la majorité des sites antigéniques de BPAG2 reconnus par les sérums de PB (Figure 2).

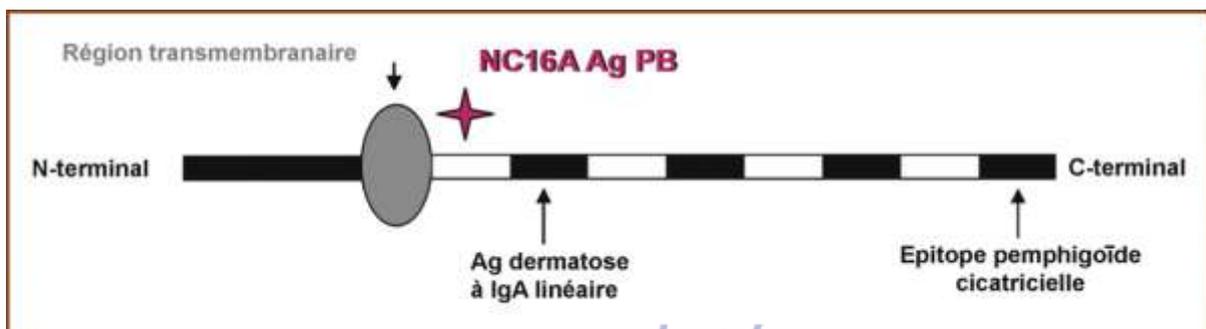


Figure 2. Organisation structurale de BP180 (d'après V. Doffoel-Hantz (26))

2.3 Critères diagnostiques

2.3.1 Critères cliniques

Les signes cliniques caractéristiques de la PB sont des bulles tendues d'apparition spontanée, de grande taille, à contenu séreux reposant sur des placards urticariens ou eczématiformes, sans signe de Nikolski (Figure 3). Le prurit est quasi constant et il peut précéder l'apparition des bulles de plusieurs semaines à quelques années. La distribution des lésions est symétrique avec une prédilection pour les faces de flexion des membres, les faces antéro-internes des cuisses et l'abdomen. L'atteinte de la région céphalique et de la muqueuse buccale est rare. L'évolution se fait par poussées et la guérison des lésions ne laisse pas de cicatrices dystrophiques ni grains de milium.



Figure 3. Patiente atteinte de pemphigoidé bulleuse (forme multibulleuse)

Ces différents critères cliniques (âge > 70 ans, absence d'atteinte muqueuse, de cicatrice atrophique ou de prédominance cervico-céphalique) ont une excellente valeur diagnostique (20). Le diagnostic clinique de PB peut être affirmé avec une sensibilité de 86%, une spécificité de 90% et une valeur prédictive positive de 95% si au moins 3 de ces 4 critères sont présents. Aux signes cliniques, s'associe une hyperéosinophilie sanguine variable corrélée à l'activité et à l'étendue de la dermatose, mais sans signification pronostique (21). On distingue les formes multi bulleuses (>10 bulles/jour sur plusieurs sites anatomiques) (Figure 3) des formes pauci bulleuses (<10bulles/jour) (Figure 4). Les formes localisées sont représentées par les malades ayant moins de 10 nouvelles bulles quotidiennes survenant sur un seul territoire anatomique.



Figure 4 : Patient atteint de pemphigoïde bulleuse -Forme pauci-bulleuse

Dans une minorité des cas, la PB peut se présenter sous des formes atypiques variées : forme eczématiforme (22) (Figure 5), forme urticairienne (23) (Figure 6), forme dyshidrosique avec atteinte principalement palmo-plantaire (24) (Figure 7), forme à type de prurigo (25), forme érosive (26).



Figure 5 : Patient atteint de pemphigoïde bulleuse – Forme eczématiforme



Figure 6 : Patient atteint de pemphigoïde bulleuse – Forme urticairienne



Figure 7 : Patient atteint de pemphigoïde bulleuse – Forme dishydrosique

2.3.2 Critères histologiques

L'histologie standard d'une bulle cutanée récente montre un décollement par clivage dermoépidermique, avec un infiltrat inflammatoire dermique composé de polynucléaires éosinophiles, de lymphocytes et d'histiocytes. Cet infiltrat prédomine dans le derme papillaire et en péri-vasculaire (27) et d'histiocytes. Des micro-abcès papillaires à polynucléaires éosinophiles ou une spongiose peuvent s'observer dans 20% des cas. Courville *et al.* (28) a proposé des critères en faveur du diagnostic histologique de PB, les critères majeurs étant la présence d'un clivage jonctionnel et la margination de polynucléaires éosinophiles le long de la jonction dermo-épidermique (Figure 8).

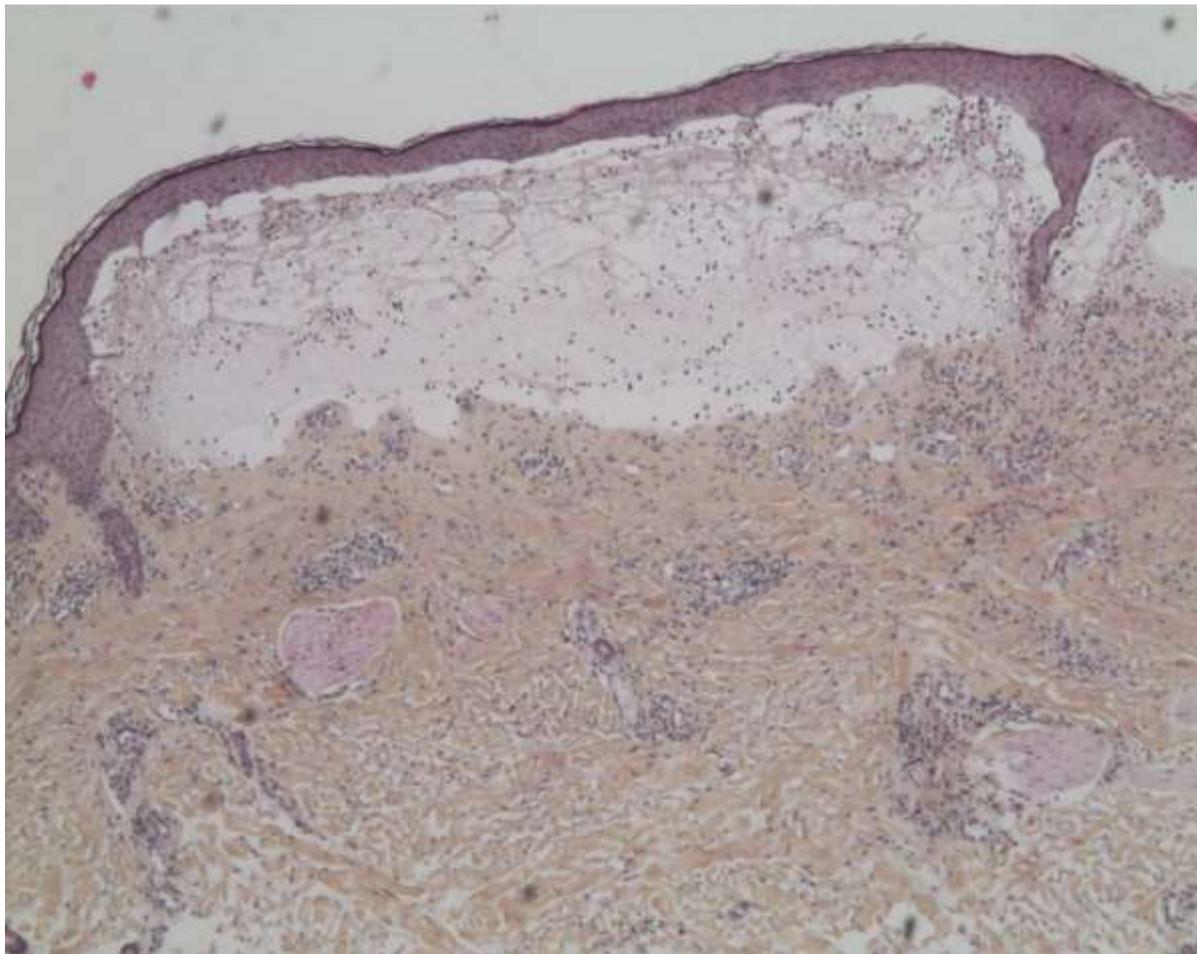


Figure 8 : Image histologique d'une pemphigoïde bulleuse : bulle sous-épidermique sans acantholyse

2.3.3 Critères immunologiques

Classiquement, l'immunofluorescence directe cutanée consiste à la réalisation d'une biopsie cutanée en peau péri-lésionnelle congelée dans l'azote liquide. Elle montre des dépôts linéaires réguliers d'IgG et de C3 le long de la membrane basale dans 80% des cas, des dépôts de C3 seul dans 15% des cas ou des dépôts d'IgG seuls dans 5% des cas (28) (Figure 9). La sensibilité et la spécificité de l'immunofluorescence directe pour le diagnostic de PB sont respectivement de 90.5 et de 95% (29). En pratique courante, la positivité de l'immunofluorescence directe constitue le critère diagnostique le plus sensible, même pour les PB atypiques.

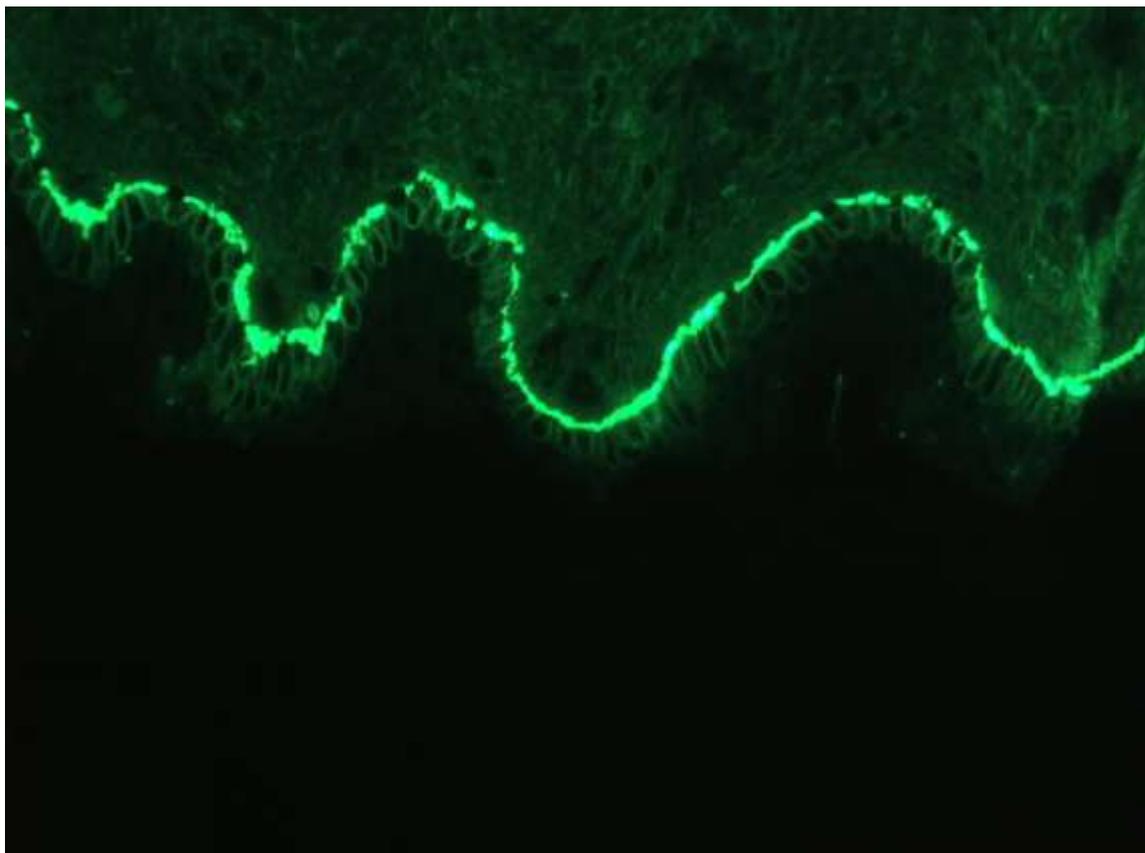


Figure 9 : Image d'immunofluorescence directe de pemphigoïde bulleuse : dépôts linéaires de C3 le long de la membrane basale de l'épiderme

2.4 Facteurs de risque

2.4.1 L'âge

L'âge élevé est le principal facteur de risque de PB, avec un risque de développer une PB est directement corrélé au grand âge : ainsi le risque est 300 fois plus important pour un patient de plus de 90 ans que pour un patient de 60 ans et moins (1).

2.4.2 Pathologies neurologiques

Les maladies neurologiques constituent un véritable facteur de risque de survenue de PB. Plusieurs études, dont une récente étude française (30) ont montré que certaines pathologies neurologiques dégénératives sont des facteurs de risque de PB : environ un tiers des malades avec PB ont une maladie d'Alzheimer, des séquelles d'accident vasculaire cérébral, une maladie de Parkinson ou une autre maladie neurodégénérative (31,32).

2.4.3 Médicaments

La forte consommation médicamenteuse des personnes âgées en France a fait suspecter l'éventuel rôle inducteur des médicaments, à l'instar de ce qui est déjà connu pour d'autres maladies auto-immunes. Deux études épidémiologiques ont suggéré le rôle inducteur potentiel de la spironolactone et des neuroleptiques (30, 33). Plus récemment, des cas ont été rapportés avec des antidiabétiques oraux, les gliptines (34).

2.4.4 Association à des maladies auto-immunes

Des associations avec d'autres maladies ont été parfois décrites à plusieurs reprises dans la littérature : diabète de type 2, thyroïdite, psoriasis, polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique, rectocolite hémorragique, cirrhose biliaire primitive, vitiligo et pemphigus vulgaire (35-41). Dans la majorité des cas, le diagnostic de PB survient alors à

des âges plus jeunes, évoquant une étiologie commune. Humbert et al a proposé de regrouper ces associations au sein du syndrome des maladies auto-immunes multiples, dont le mécanisme sous-jacent reste malgré tout inconnu (42). Cependant, la fréquence de ces associations restant assez faible, cela n'élimine pas une relation fortuite. Pour le moment, la seule étude cas-témoin réalisée n'a pas démontré qu'il existe un risque plus important de maladie auto-immune en cas de PB (43).

2.5. Pemphigoïde bulleuse et auto-immunité

Les connaissances sur la physiopathologie de la PB ont beaucoup progressé au cours des dernières années. Alors que ses auto-antigènes cibles sont parfaitement identifiés et que le rôle pathogène des auto-anticorps correspondant ne fait aucun doute, le rôle de la réponse immune à médiation cellulaire est de plus en plus étudié.

2.5.1 La réponse immune à médiation humorale

Elle passe par la sélection et la prolifération d'un clone plasmocytaire, dont le mécanisme de sélection est mal connu. Ce clone plasmocytaire sécrète des anticorps anti membrane basale de l'épiderme (sous classes IgG1 et IgG4) et par conséquent, développe une rupture de tolérance par modification des protéines de structure de la membrane basale épidermique.

Pour la plupart des patients, ces IgG sont dirigées contre le domaine le plus immunogène de BP180 : le domaine NC16A (44, 45). Au-delà du clone plasmocytaire, il semble exister des lymphocytes B mémoire circulants spécifiques du domaine NC16A au cours de la PB, sécréteurs d'auto anticorps. En plus de l'immunité spécifique contre BP180, 60% des patients ont également des IgG contre la partie carboxy-terminale de BP230 (46).

Les auto-anticorps de la PB vont se lier spécifiquement à leur antigène cible dans l'hémidesmosome, avec comme conséquence une activation du complément (Figure 10). Cette activation peut se faire aussi bien par la voie classique que par la voie alterne et met en jeu le complexe d'attaque membranaire C5-C9 (47, 48). Des souris déficientes en fraction C5 du complément sont incapables de former des lésions bulleuses lorsque des anticorps anti-BP180 leur sont injectés (49).

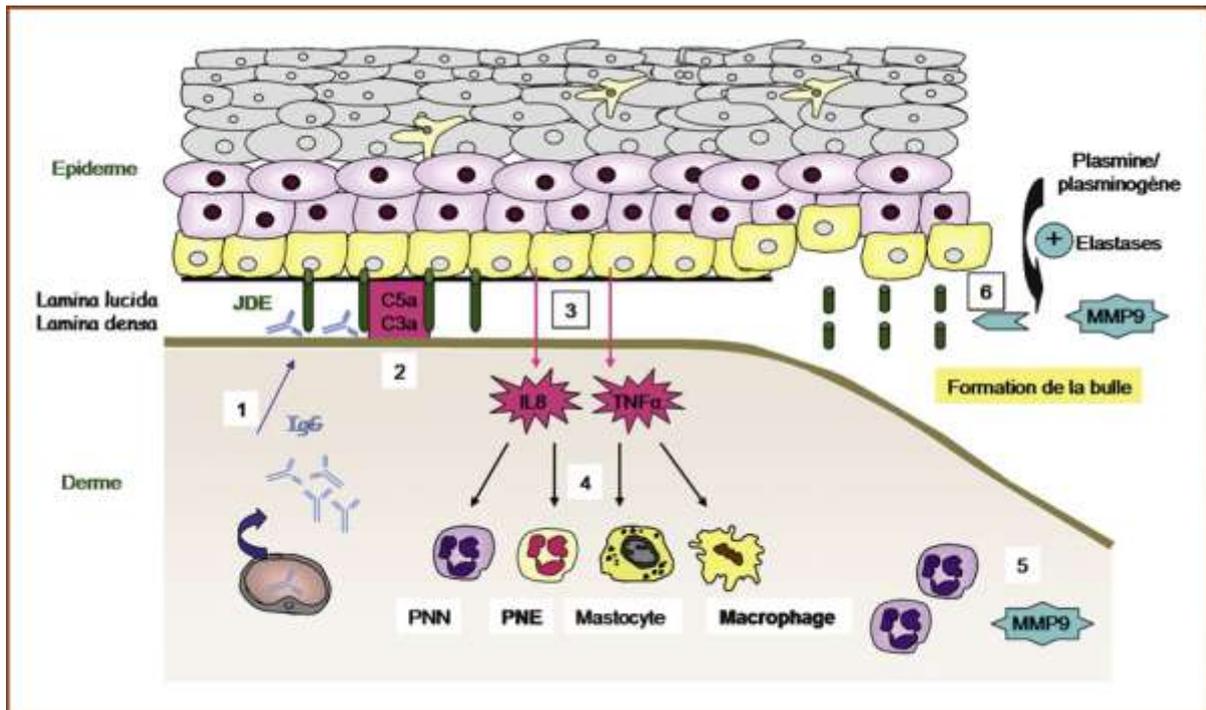


Figure 10. Mécanismes de formation des bulles (d'après Di Zenzo et al.) (50)

1. Sécrétion des autoanticorps spécifiques de l'hémidesmosome. 2. Activation du complément. 3. Activation des kératinocytes basaux. 4. Recrutement des cellules inflammatoires : polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, mastocytes et macrophages. 5. Sécrétion de la MMP 9. 6. Clivage du domaine extracellulaire collagénique de BP180, clivage dermoépidermique et formation d'une bulle.

JDE : jonction dermoépidermique ; C3a, C5a : fractions 3a et 5a du complément ; PNN : polynucléaire neutrophile ; PNE : polynucléaire éosinophile ; MMP 9 : métalloprotéinase matricielle 9 ; IL-8 : interleukine-8 ; TNF- α : tumor necrosis factor- α .

2.5.2 La réponse immune à médiation cellulaire

L'existence et l'importance de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ont été étudiées récemment dans la PB. On sait depuis longtemps que dans la peau péri lésionnelle des PB on retrouve un infiltrat cellulaire composé majoritairement de lymphocytes T, de type auxiliaire. Des lymphocytes T autoréactifs (LT helper), spécifiques du domaine immunodominant NC16A, ont été mis en évidence dans la PB (51). Cependant, ces lymphocytes ont également été retrouvés chez des volontaires sains (52). Ces LT helper ont un effet pathogène direct sur l'hémidesmosome en étant responsables de la libération de diverses cytokines, en particulier

IL-2, interféron- α , IL-6 et IL-10 (53). Ces données suggèrent que les deux voies Th1 et Th2 sont impliquées au cours de la PB et que les LT helper régulent la réponse immunitaire humorale. Les cytokines Th1, notamment l'IL-2 et l'IFN- α , sont susceptibles d'induire la sécrétion d'anticorps de type IgG1 et IgG2. Les cytokines Th2 avec surtout l'IL-4 et l'IL-10 interviennent dans la synthèse des IgG4 et des IgE (54).

Plus récemment, le rôle crucial de Th17 a été mis en évidence dans la physiopathogénie des maladies auto-immunes et notamment dans la PB (55). En 2011, Arakawa et al. a mis en évidence l'augmentation de Th17 et la diminution de la population lymphocytes T régulateurs en peau péri lésionnelle dans la PB (56). Ainsi, le déséquilibre entre les lymphocytes T helper et les cellules T régulatrices, et l'augmentation de la population Th17 sont les différentes voies immunitaires possibles de déclenchement de PB (57). Ces données récentes ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension physiopathologique mais également la prise en charge de la PB.

2.6 Traitement de la pemphigoïde bulleuse

Il n'existe actuellement pas de traitement préventif de la survenue de PB. Par ailleurs, la PB est une maladie chronique, évoluant par poussées, avec un risque de récurrence à l'arrêt du traitement. A l'heure actuelle, l'objectif du traitement de la PB est de traiter l'éruption bulleuse et de prévenir l'apparition de récurrences, en limitant au maximum les effets secondaires. La prise en charge initiale est habituellement hospitalière jusqu'au contrôle clinique de la maladie, défini par l'absence d'apparition de nouvelles bulles.

2.6.1 Corticothérapie locale

La corticothérapie locale est actuellement le traitement de référence de la PB (58). Le dermocorticoïde de référence est le propionate de clobetasol (Derموال®). Dans les formes étendues, il doit être appliqué sur l'ensemble de la surface cutanée. La dose quotidienne de dermocorticoïde ainsi utilisé est généralement comprise entre 20 et 30 g/j. La PB étant une pathologie chronique, le traitement est généralement prolongé et nécessite d'être diminué progressivement. L'arrêt du traitement peut être proposé chez un patient en rémission clinique sous faible dose de corticothérapie topique (dose inférieure ou égale à 20g par semaine).

2.6.2 Traitements immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs sont utilisés dans la PB dans les formes corticorésistantes de la maladie mais aussi dans un but d'épargne des corticoïdes. Ce sont des traitements de seconde intention car ils présentent tous, à des degrés divers des risques de complications graves : corticothérapie générale à la dose moyenne de 0.5mg/kg/j, le méthotrexate en moyenne à 10mg/semaine, l'azathioprine (Imurel®) à 2 à 3 mg/kg/j, le cyclophosphamide (Endoxan®) à 2mg/kg/j et le mycophénolate mofétil (Cellcept®) à 1 à 1,5 g/j.

III. Vitamine D

3.1 Métabolisme et mode d'action de la vitamine D

La vitamine D est une molécule lipophile synthétisée à partir d'un dérivé du cholestérol (12). La principale source de vitamine D est l'exposition aux ultraviolets B (UVB). Les autres sources sont l'alimentation et la supplémentation. Le terme « vitamine » n'est pas correct, car les apports alimentaires ne sont pas nécessaires si l'exposition solaire est suffisante : il s'agit d'une hormone, et spécifiquement d'une hormone sécostéroïde (12-16)

Le terme de vitamine D inclut la vitamine D₂ (=ergocalciférol), d'origine végétale, qui est le produit d'irradiation de l'ergostérol (provitamine D apportée par l'alimentation) sous l'action des UVB au niveau de la peau, et la vitamine D₃ (=cholécalficérol), d'origine animale, fournie directement par les aliments ou produite par l'action des UVB à partir du cholestérol après sa transformation en 7-déhydrocholestérol (12, 59) (Figure 11).

La vitamine D native subit une 25- puis une 1 α -hydroxylation pour devenir biologiquement active. La première hydroxylation a lieu dans le foie, sous l'influence de plusieurs enzymes (enzyme clé CYP2R1) où le cholécalficérol est transformé en calciférol (25-hydroxyvitamine D = 25OHD) qui est la forme circulante. L'activité de la 25-hydroxylase hépatique est régulée uniquement par les taux de cholécalficérol. Le dosage de 25OHD permet donc d'estimer l'ingestion et les réserves de vitamine D (12,60).

La seconde hydroxylation a lieu au niveau des cellules tubulaires rénales où le calcifédiol est alpha-hydroxylé en calcitriol (1,25 dihydroxyvitamine D = 1,25OHD) qui est la forme active de la vitamine D. L'activité de la 1 α -hydroxylase rénale est régulée par des paramètres du métabolisme phosphocalcique comme la parathormone (PTH), qui stimule la synthèse de 1- α -hydroxylase. Par ailleurs, le taux de PTH dépend de la calcémie. Une baisse de la calcémie entraîne une augmentation de la PTH et donc synthèse de la 1- α -hydroxylase (12).

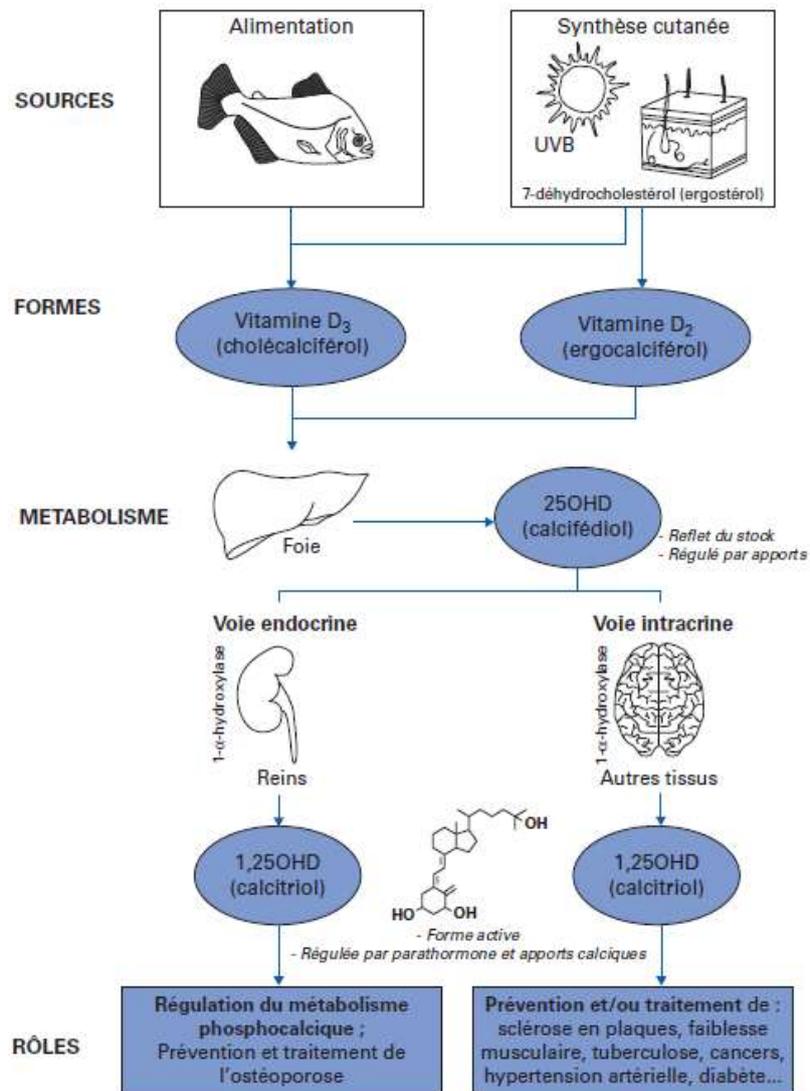


Figure 11. Différentes voies du métabolisme de la vitamine D (d'après Annweiler et al.) (61)

Récemment, il a été montré que quasiment tous les tissus humains (système nerveux, vaisseaux sanguins, peau, prostate, sein, colon, pancréas, glandes parathyroïdes ou encore cellules dendritiques) étaient dotés de 1- α -hydroxylase, ce qui signifie que toutes les cellules nucléées ou presque sont des cibles potentielles du calcitriol des organes (62-65). Ces sites sont donc capables de synthétiser en petite quantité une forme active de vitamine D destinée à avoir une action locale, permettant une synthèse extra-rénale de calcitriol, susceptible d'agir de manière intracrine, autocrine ou paracrine (66,67).

3.2 Mode d'action

La vitamine D est une hormone sécostéroïde en raison de son mode d'action (12). La 1,25OHD est transportée par la vitamin D-binding protein vers ses cellules cibles, sur lesquelles elle exerce ses effets en se liant au récepteur nucléaire à la vitamine D (VDR) qui forme un complexe (68,69). Ce complexe se fixe aux éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) situés dans le promoteur des gènes cibles, régulant positivement ou négativement leur transcription.

3.3 Le statut vitaminique D

Le statut vitaminique D est habituellement estimé en dosant les concentrations sériques de 25OHD. La spectrophotométrie de masse après extraction et purification est la technique de référence (70). Néanmoins, en utilisant le dosage ne reconnaissant que la vitamine 25OHD, on risque de sous-estimer le statut vitaminique D d'un patient traité par Vitamine D2. Par conséquent, les techniques de dosage utilisées de façon routinière font appel à des méthodes d'immunoanalyse qui reconnaissent la 25OHD (70). Ces méthodes sont plus simples, plus rapides et plus accessibles que la spectrophotométrie de masse.

Les valeurs de références pour la 25OHD consistent à définir un seuil à partir de laquelle apparaissent des événements de santé délétères. La détermination du seuil de l'hypovitaminose D reste néanmoins complexe en raison de la multitude de troubles engendrés par l'hypovitaminose D. Ainsi, historiquement, le statut normal de 25OHD a d'abord été défini par l'évitement des effets délétères osseux. Il est en effet reconnu depuis longtemps qu'il n'y a pas de rachitisme ni ostéomalacie pour des concentrations sériques supérieures à 10 ng/mL (71), et pas d'hyperparathyroïdie secondaire, impliquant un remodelage osseux accéléré et une diminution de la densité minérale osseuse en particulier au niveau de l'os cortical, au-dessus de 20 ng/mL.

Néanmoins, Bischoff-Ferrari et al. (72) ont également démontré que la concentration en 25OHD, permettant d'éviter les effets délétères non osseux, commence à 30 ng/mL. Ces observations sont cohérentes avec les recommandations d'un groupe consensus d'experts ayant situé en 2006 la valeur de référence de la 25OHD entre 20 et 40 ng/mL avec une tendance à cibler 30 ng/mL (73).

Ainsi, lorsque le taux sérique de 25OHD est supérieur à 30 ng/mL (75 nmol/L), les réserves sont dites « suffisantes » et le statut vitaminique D peut être qualifié d'« optimal ». À l'inverse, le terme de statut vitaminique D « suboptimal » est souvent utilisé lorsqu'il est inférieur à 30 ng/mL. On distingue l'insuffisance, définie par un taux de 25OHD compris entre 10 et 30 ng/mL, de la carence, définie par un taux inférieur à 10 ng/mL (25 nmol/L). L'intoxication vitaminique D est un risque théorique aux posologies recommandées (74).

(Figure 12)

	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">ng/mL</div> <div style="flex-grow: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> 25OHD sérique → </div> </div>						
	10	20	30	40	80	150	
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">nmol/L</div> <div style="flex-grow: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> 25 375 </div> </div>						
Statut vitaminique D <i>(Terme anglais)</i>	Carence <i>(Deficiency)</i>	Insuffisance <i>(Insufficiency)</i>	Insuffisance <i>(Insufficiency)</i>	Normalité ? <i>(Sufficiency?)</i>	Normalité ? <i>(Sufficiency?)</i>	Toxicité à long terme ?	Toxicité <i>(Toxicity)</i>
Prévalence (%)	25	35	25	10	5	-	-
Manifestations cliniques et biologiques	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Osteomalacie ▪ Hyperparathyroïdie ▪ Effets non osseux 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hyperparathyroïdie ▪ Effets non osseux 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Effets non osseux 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Effets non osseux ? 	Statut optimal	?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypercalcémie ▪ Lithiase calcique
Supplémentation	Au moins 800-1000 UI de vitamine D ₃ par jour avec un contrôle du taux sérique de 25OHD à 3 mois			?	Non	Stop	Stop

Figure 12. Statut vitaminique chez la personne âgée (d'après Annweiler et al.) (61)

3.4 Action de la vitamine D sur les voies immunitaires

Les effets de la vitamine D sur le métabolisme phosphocalcique et osseux sont bien connus.

Parallèlement, les effets extra-osseux de la vitamine D sont de mieux en mieux documentés, notamment ses effets immunomodulateurs.

De façon schématique, les cellules dendritiques capturent l'antigène en périphérie, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles initient la réponse immunitaire primaire en présentant l'antigène aux lymphocytes T naïfs. Pendant leur migration, elles subissent un processus de maturation augmentant leurs propriétés immunostimulatrices (75). Les cellules dendritiques myéloïdes (M-DC) sont les cellules présentatrices d'antigène les plus efficaces mais peuvent être, selon les conditions, immunogènes ou tolérogènes (75,76). Les M-DC tolérogènes se caractérisent par leur immaturité relative, leur moindre expression des molécules de costimulation comme le CD40, le CD80 et le CD86, une production diminuée d'IL-12 et une synthèse accrue d'IL-10.

Des études concordantes suggèrent que les M-DC sont des cibles clés du calcitriol, qui module leur phénotype. Le calcitriol leur confère de façon stable et durable un profil tolérogène, caractérisé notamment par une diminution de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et des molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86, une diminution de la synthèse d'IL-12 et une augmentation de la production d'IL-10 (75). Par son action sur les M-DC, le calcitriol induit à partir de lymphocytes T naïfs la différenciation de lymphocytes T régulateurs, tels que les lymphocytes T régulateurs exprimant forkhead box protein 3 (Foxp3) (77), mais également lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 (Tr1). De plus, les M-DC modulées par le calcitriol surexpriment le récepteur inhibiteur ILT3 qui semble impliqué dans l'induction des lymphocytes T régulateurs exprimant Foxp3. De même, le calcitriol module la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs en partie par le biais de son action sur

les M-DC. La diminution de la synthèse d'IL-12 et d'IL-23 par les M-DC sous l'effet du calcitriol aboutit à un blocage de la différenciation en lymphocytes Th1 et Th17 (78-80), considérés comme des chefs d'orchestre de l'auto-immunité.

Enfin, il a été montré que les M-DC exposées au calcitriol entraînaient une anergie et induisaient l'apoptose des lymphocytes T autoréactifs. (Figure 13)

Toutefois, il est désormais établi que le calcitriol exerce une action directe sur les lymphocytes T, indépendante de son action sur les cellules dendritiques, notamment sur les lymphocytes T activés dont l'expression du VDR est accrue par rapport aux lymphocytes T naïfs. Il a ainsi été montré que l'exposition de lymphocytes T CD4⁺ activés au calcitriol diminuait l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- α et l'IL-17, cytokines effectrices des réponses Th1 et Th17 respectivement, sans modifier la prolifération, et favorisait en synergie avec l'IL-2, l'émergence de lymphocytes T régulateurs exprimant Foxp3 et CTLA-4 (80). (Figure 13)

Ainsi, les différents mécanismes d'action de la 25OHD sur les voies immunitaires humorales et cellulaires suggèrent qu'elle pourrait avoir un effet sur le mécanisme physiopathologique de la PB.

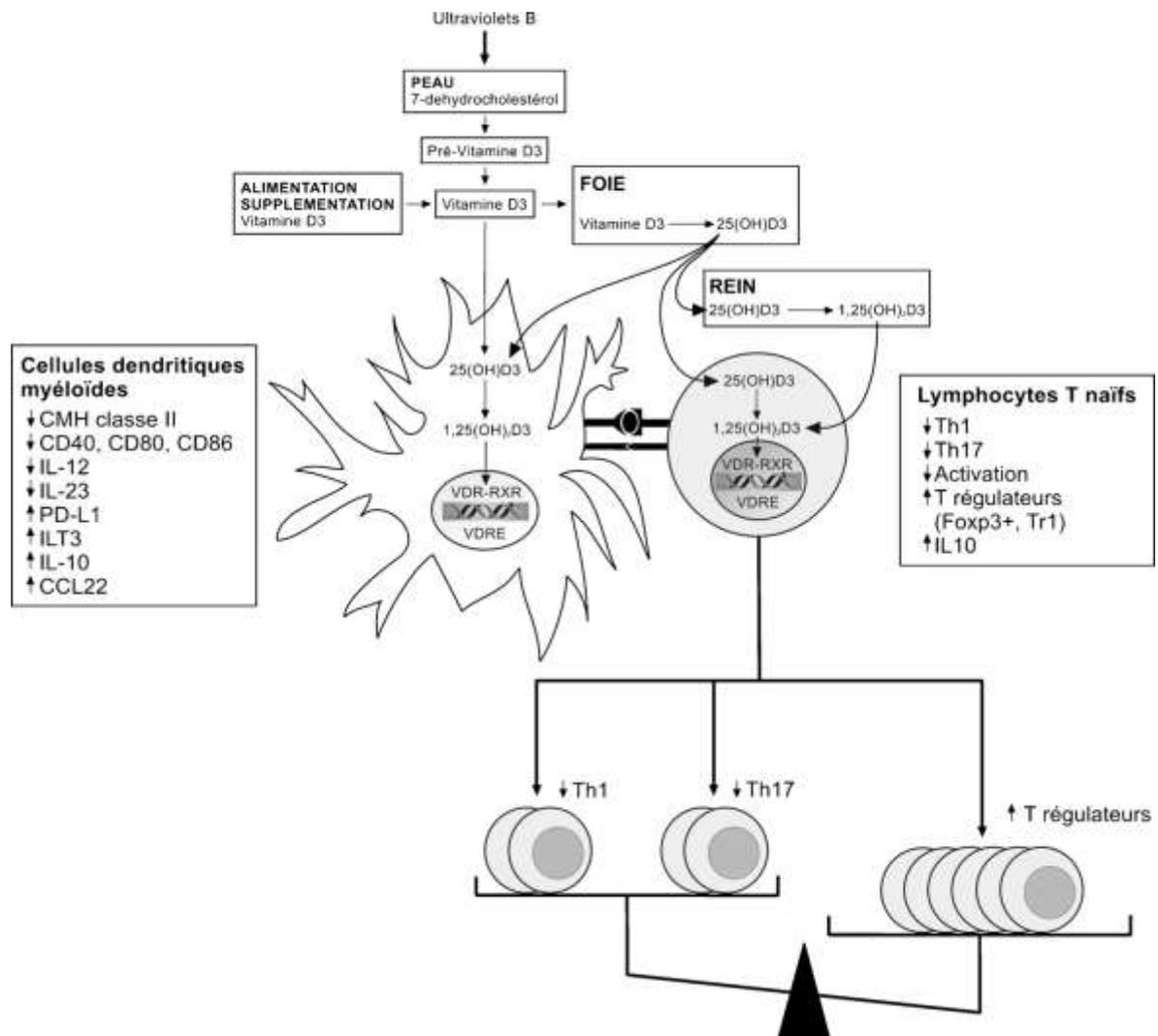


Fig. 13. La vitamine D provient de l'alimentation et de la supplémentation, mais surtout de l'exposition aux ultraviolets B qui entraînent au niveau de l'épiderme la conversion du 7-déhydrocholestérol en pré-vitamine D3, rapidement convertie en vitamine D3 native. La vitamine D native subit une 25- puis une 1_-hydroxylation pour devenir biologiquement active, au niveau du foie et du rein respectivement. Les cellules dendritiques expriment le VDR à l'état basal, les lymphocytes T et B essentiellement à l'état activé. Les macrophages et les cellules dendritiques expriment les enzymes nécessaires aux deux étapes d'hydroxylation de la vitamine D native, alors que les lymphocytes T activés et les lymphocytes B n'expriment que la 1_-hydroxylase. Le calcitriol produit localement agirait sur le système immunitaire de fac, on intracrine, autocrine ou paracrine. Les cellules dendritiques myéloïdes (M-DC) sont des cibles clés du calcitriol, qui leur confère un profil tolérogène caractérisé notamment par une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II, des molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86, une diminution de la synthèse d'IL-12 et d'IL-23, une augmentation de l'expression de la molécule inhibitrice PD-L1, du récepteur inhibiteur ILT3, de la production d'interleukine 10 (IL-10). Via cette action sur les M-DC, le calcitriol induit à partir de lymphocytes T naïfs la différenciation de lymphocytes T régulateurs exprimant forkhead box protein 3 (Foxp3) et de lymphocytes T régulateurs de type 1 sécréteurs d'IL-10 (Tr1), réprime la différenciation en lymphocytes T-helper-1 (Th1) et Th17. L'augmentation de la production de la chimiokine CCL22 par les M-DC sous l'action du calcitriol augmente le recrutement des lymphocytes T régulateurs exprimant CCR4 [13]. Le calcitriol exerce une action directe sur les lymphocytes T : il diminue l'expression d'interféron- γ et d'IL-17, cytokines effectrices des réponses Th1 et Th17 respectivement, diminue l'activation lymphocytaire, favorise l'émergence de lymphocytes T régulateurs exprimant Foxp3 et CTLA-4, de lymphocytes T régulateurs Tr1 et augmente la synthèse d'IL-10 (d'après Schoindre Y (81))

3.5 Vitamine D et auto-immunité

La vitamine D est souvent cantonnée à son rôle dans le métabolisme phosphocalcique et osseux. Une littérature exponentielle traite de ses effets extra-osseux, en particulier de son rôle central dans la physiologie du système immunitaire, où elle agit à plusieurs niveaux afin de maintenir la tolérance au soi, par les mécanismes décrits dans le paragraphe précédent.

Nous disposons aujourd'hui de données mieux documentées sur le rôle de la vitamine D dans la prévention des maladies auto-immunes. Par exemple, dans la sclérose en plaque, une étude américaine à grande échelle (n=257) a établi un lien entre le taux sanguin de 25OHD et le risque de sclérose en plaques. Au total, les sujets dont les taux sériques de 25OHD se situaient dans la partie supérieure avaient un risque d'avoir une sclérose en plaques inférieur à 62 % (82). Chaque élévation de 20 ng/ml de 25OHD était associée à une réduction du risque de SEP de 41% (82).

Un autre exemple de maladies auto-immunes pour laquelle le rôle protecteur de la vitamine D a été rapporté est celui du lupus. Plusieurs travaux récents rapportent une corrélation inverse entre le taux de 25OHD et l'activité du lupus mesurée par le SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) ou par l'ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measurement) (83)

Ainsi, certains auteurs considèrent qu'un statut vitaminique D « suboptimal » constituerait un facteur environnemental entraînant une hyperactivation du système immunitaire, synonyme d'augmentation de l'activité de la maladie (83). Dans cette hypothèse, l'obtention durable d'un taux sérique élevé de 25OHD pourrait s'accompagner d'une diminution du risque de survenue de poussée.

Ainsi, un taux sérique élevé de 25OHD pourrait prévenir l'apparition et la pérennisation des maladies auto-immunes, ce qui est sous-tendu par un faisceau d'arguments :

- arguments expérimentaux avec le rôle bénéfique de l'administration de calcitriol dans les modèles animaux de maladies auto-immunes (84)
- arguments épidémiologiques, comme l'incidence plus élevée de certaines maladies auto-immunes dans les régions à haute latitude ou encore l'existence d'une corrélation entre le taux sérique de 25OHD et les scores d'activité utilisés (82,83)
- études cliniques montrant un effet préventif ou thérapeutique (85)

IV. Hypothèse

Un faisceau d'arguments suggère la vitamine D peut jouer un rôle dans la physiopathologie de la PB chez la personne âgée, et notamment que des taux bas de 25OHD peuvent être associés plus souvent à la survenue de la maladie et sa sévérité.

V. Objectifs

5.1 Objectif primaire

Notre objectif principal était de déterminer, chez la personne âgée hospitalisée, si une hypovitaminose D était plus fréquente dans une population de patients atteints de PB comparativement à une population témoin.

5.2 Objectif secondaire

Notre objectif secondaire était d'évaluer s'il existait, chez les patients porteurs d'une PB, une relation entre la sévérité de la PB et les concentrations sériques de 25OHD.

VI. Matériels et méthodes

Notre étude était une étude cas-témoins, réalisée du 1^{er} novembre 2012 au 1^{er} février 2014.

6.1 Participants :

6.1.1 Critères d'inclusion

- **Age \geq 70 ans**
- **Cas :** primo-diagnostic de PB chez un patient hospitalisé dans le service de dermatologie du CHU d'Angers, confirmé par l'histologie et l'immunofluorescence directe
- **Témoins :** patient hospitalisé dans le service de dermatologie du CHU d'Angers pour un motif dermatologique autre qu'une maladie auto-immune bulleuse
- **Sujet n'ayant pas émis d'opposition à participer à l'étude**

6.1.2 Critères de non inclusion :

- **Supplémentation vitaminique D datant de moins de 3 mois**

6.1.3 Méthode d'appariement :

- **Age +/- 3 ans,**
- **Sexe,**
- **Couleur de peau (peau noire ou non)**
- **Saison du dosage sanguin de vitamine D**

6.2 Pemphigoïde bulleuse

6.2.1 Méthode diagnostique

Nous avons recruté uniquement des patients hospitalisés dans le service de Dermatologie du CHU d'Angers avec un primo-diagnostic de PB. Les patients hospitalisés pour des récurrences de PB n'ont pas été retenus. **Le diagnostic de PB était évoqué sur des critères cliniques, confirmé ensuite par une histologie cutanée et une immunofluorescence (20, 27-29).**

6.2.2 Evaluation de la sévérité

La sévérité de la maladie a été évaluée selon les deux critères suivants : le nombre de bulles, et le nombre de territoires cutanés atteints reflétant l'étendue de la maladie.

Le **nombre de bulles** correspondait à la moyenne de bulles présentées par le patient sur l'ensemble du corps lors du diagnostic, sur les 3 premiers jours d'hospitalisation. Ainsi, le nombre de bulles était classé en 4 catégories :

- Grade 1 : 0 à 5 bulles,
- Grade 2 : 6 à 20 bulles,
- Grade 3 : 21 à 50 bulles,
- Grade 4 : Plus de 50 bulles.

Par ailleurs, la sévérité de la PB prenait en compte **l'étendue des lésions**, c'est-à-dire le nombre de parties du corps concernées par la maladie parmi les 5 suivantes (grade de 0 à 5), lors du diagnostic :

- Membres inférieurs
- Membres supérieurs
- Face postérieure du thorax
- Face antérieure du thorax
- Pelvis.

6.3 Concentration sérique de 25OHD

Un dosage de 25OHD (en nmol/L) été réalisé pour chaque patient (PB et témoins) à jeun au CHU d'Angers, dans un centre unique. Ce dosage a été effectué par une technique radioimmunologique (DiaSorin, Incstar). Avec cette méthode, il n'est pas rapporté d'interférence avec les lipides, ce qui est parfois retrouvé avec les autres méthodes non chromatographiques.

Ce dosage était réalisé le jour de l'inclusion du patient, avant toute prise en charge thérapeutique.

6.4 Potentiels facteurs de confusion

Tous les participants ont bénéficié d'un examen clinique complet réalisé par un médecin, de mesures anthropométriques et du remplissage d'un questionnaire standardisé (cf Annexe 1) reprenant les données suivantes : les **caractéristiques cliniques et démographiques** (âge, sexe, indice de masse corporelle (IMC), nombre de maladies chroniques et score au S-MMSE), les **mesures environnementales et fonctionnelles** (saison d'inclusion, exposition solaire et score fonctionnel), et enfin **une mesure biologique** (dosage sanguin de la PTH)

L'indice de masse corporelle a été calculé selon l'indice de Quetelet à partir de la taille et du poids, selon la formule $\text{taille} / \text{poids}^2$ en kg/m^2 .

Le nombre de maladies chroniques a été recueilli par un médecin selon les données rapportées par le médecin qui adressait le patient en hospitalisation, complété par l'interrogatoire du patient ou d'un membre de sa famille. Une maladie chronique était définie par une maladie présente depuis plus de trois mois et toujours évolutive.

Le test de mémoire appelé S-MMSE (Short Mini-Mental Status Examination) est extrait du MMSE. Il s'agit d'un test en 2 étapes : répétition immédiate puis mémorisation de 3 mots simples énoncés oralement « *Cigare, Fleur, Porte* ». Il s'agit d'un test rapide (moins de 3 minutes) utilisé pour le diagnostic précoce de la démence. C'est un test fiable, reproductible, validé, dont la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 81% et 90% (86)

L'exposition solaire au cours des 3 derniers mois était évaluée par une question posée à chaque patient avec une réponse binaire « *Lorsqu'il fait beau, restez-vous plus d'1/4 d'heure exposé au soleil (visage et mains découvertes) entre 11h et 15h ?* » (87).

Le test fonctionnel utilisé dans cette étude était la « mini-IADL » version simplifiée en 4 questions du test IADL (Instrumental Activities of Daily Living) : évaluation de la capacité à répondre au téléphone, à utiliser les moyens de transport, à la prise médicamenteuse et à la gestion de son argent. Chaque item est coté sur 1 point. Un score de 0 correspond à une autonomie complète et un score de 4 à une dépendance totale (88).

Le dosage de la PTH a été réalisé le même jour que le dosage de 25OHD, également lors d'un prélèvement à jeun. Le taux de PTH est mesuré selon la technique d'immunoanalyse par chimioluminescence directe (CLIA) (DiaSorin, Incstar). Tous les dosages ont été réalisés au laboratoire du CHU d'Angers.

6.5 Analyse statistique

Les caractéristiques des participants ont été résumées en utilisant des moyennes et écart-types (ET) ou des fréquences et pourcentages, selon les cas. La normalité de la distribution a été vérifiée par le test de Skewness-Kurtosis. Comme le nombre des observations était supérieur à 40, les comparaisons n'étaient pas affectées par la courbe de distribution et aucune transformation n'a été utilisée (89).

Premièrement, nous avons comparé les cas de PB et les témoins en utilisant le test du Chi2 ou

test *t* de Student, selon les cas.

Enfin, des corrélations de Pearson ont été utilisées chez les cas de PB pour examiner la relation entre la concentration sérique de 25OHD et la sévérité de la PB (grade de nombre de bulles, et étendue de la PB). Les valeurs de $p < 0.05$ étaient considérées comme statistiquement significatives. Toutes les statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS (v19.0, IBM Corporation, Chicago, IL).

6.5 Approbation du protocole et consentements

Les participants ont été inclus dans cette étude après avoir reçu une information orale et écrite loyale claire et appropriée (cf Annexe – formulaire de non opposition). Cette étude est en accord avec la norme éthique de la déclaration d'Helsinki (1983). Cette étude a reçu l'avis favorable du comité d'éthique du CHU d'Angers le 11/01/2012 (N°1635125 v0).

VII. Résultats

7.1 Résultats principaux

Sur une durée de 16 mois, nous avons recruté 30 patients avec une PB (21 femmes et 9 hommes) et 60 témoins appariés sur l'âge (+/- 3ans), le sexe, la couleur de la peau et la saison d'inclusion. L'âge moyen lors du diagnostic était de 83 ans (Tableau 1). Au total, 7 patients avec un diagnostic de PB n'ont pas pu être inclus en raison de leur jeune âge (<70ans) ou d'une supplémentation en 25OHD (n=5) dans les 3 mois précédant l'inclusion (Figure 14).

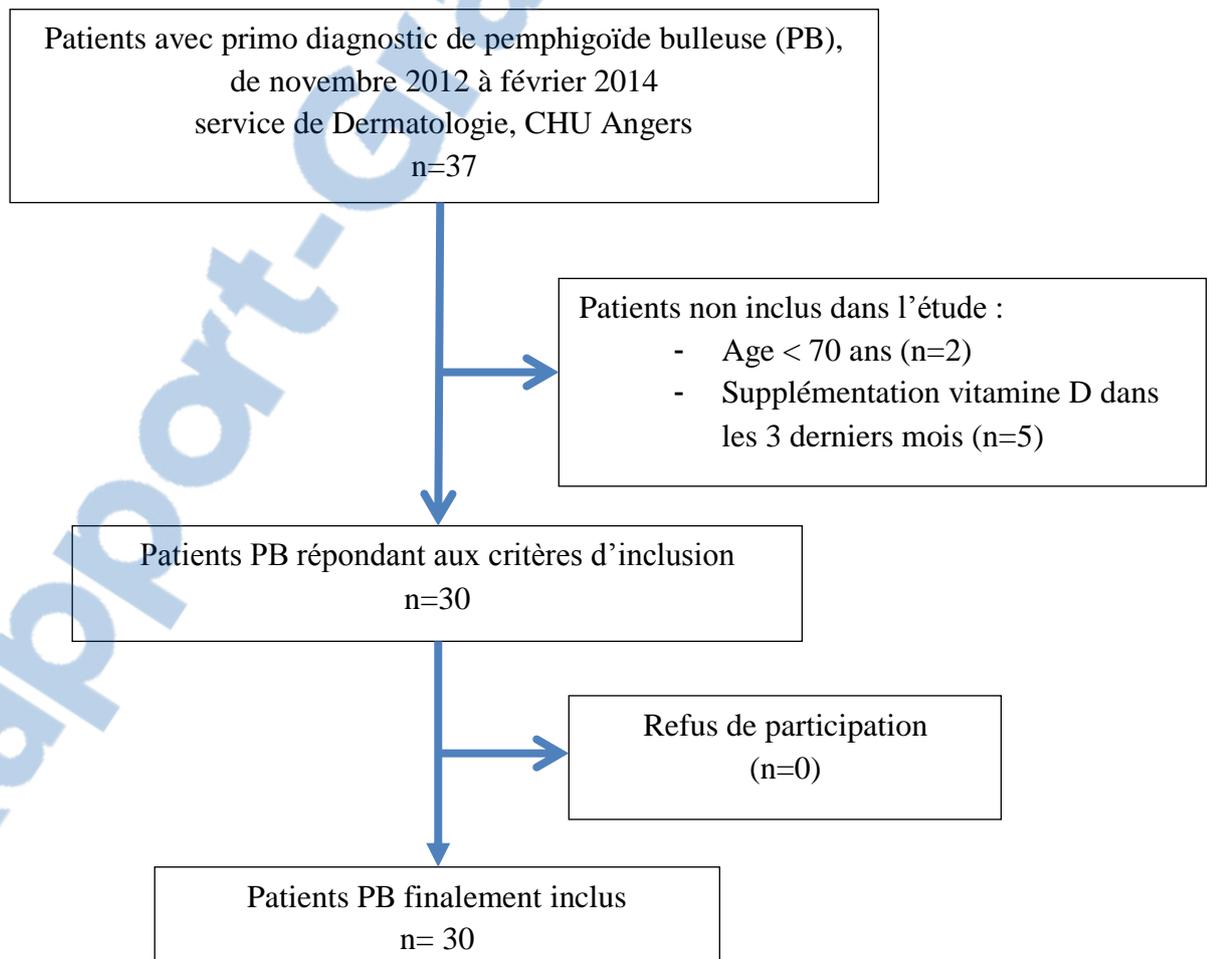


Figure 14. Diagramme de flux de la sélection des patients PB

Le taux moyen de 25OHD de la totalité de l'échantillon (n=90) était de $33,0 \pm 18,8$ nmol/L. La comparaison entre les cas de PB et les témoins ne nous a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre le taux moyen de 25OHD chez les patients PB ($29,6 \pm 17,1$) par rapport aux témoins sans PB ($34,8 \pm 19,6$) ($p=0.211$) (Tableau 1). Par ailleurs, il n'existait pas de différences significatives entre les 2 groupes.

7.2 Analyse complémentaire post-hoc

L'absence de différence significative entre nos 2 populations ne nous a pas permis de répondre à l'hypothèse initialement formulée, nous avons donc réalisé des analyses post-hoc en émettant une nouvelle hypothèse de travail. Au regard de la littérature, comme nous l'avons décrit dans les paragraphes précédents, il semblerait que les relations entre les concentrations sériques de 25OHD et maladies auto-immunes ont été réalisées en étudiant l'influence d'un taux élevé de 25OHD. En effet, des taux élevés ont été associés à une amélioration clinique, voir à une réduction du risque de survenue de maladies auto-immunes.

Sur la base de cette hypothèse nous avons donc examiné l'association entre taux de 25OHD élevé et PB. Puisque l'étude n'était pas planifier initialement pour cela, le nombre de participants n'étaient pas suffisant pour faire une analyse d'association avec des modèles linéaire. Nous avons donc segmenté notre population en quartiles. Les concentrations sériques de 25OHD élevées ont donc été définies par le plus haut quartile de 25OHD, c'est-à-dire ici pour une concentration de $25OHD \geq 49$ nmol/L. Des modèles des régressions logistiques non ajustées et ajustées ont été alors utilisées pour examiner l'association entre le plus haute quartile de 25OHD sérique (≥ 49 nmol/L ; variable explicative) et les cas de PB (variable à expliquer), en ajustant sur les potentiels facteurs de confusion (tableau 2). Quel que soit le

modèle utilisé, un taux élevé de 25OHD était moins fréquemment associé au diagnostic de PB (modèle 1 sans ajustement OR = 0.30, IC 95% [0.09 ;0.99] avec $p=0.049$; modèle 2 ajusté sur les caractéristiques cliniques et démographiques OR=0.245, IC95% [0.07 ;0.86] avec $p=0.029$; pour le modèle 3 ajusté sur modèle 2 + les mesures environnementales et fonctionnelles OR =0.25, IC95% [0.07 ;0.87] avec $p=0.030$, et le modèle 4 ajusté sur modèle 3 + les variables biologiques OR =0.26, IC95% [0.07 ;0.96] avec $p=0.044$).

Puisque l'association était significative avec des taux de 25OHD élevés, nous avons donc pu explorer la relation avec la sévérité de la maladie. Au total 16 patients avaient 5 bulles ou moins au moment du diagnostic, 8 avaient entre 6 et 20 bulles, 3 avaient entre 20 et 50 bulles et enfin, 3 patients avaient plus de 50 bulles. Cinq cas de PB (16%) présentaient une étendue de la maladie importante avec atteinte des 5 territoires cutanés individualisés (Tableau 1). Chez les cas de PB, les taux élevés de 25OHD étaient inversement corrélés à la sévérité de la PB, que ce soit pour le nombre de bulles ($p=0.023$) (Figure 15.A) ou l'étendue de la PB ($p=0.08$) (Figure 15.B).

Tableau 1. Caractéristiques et comparaison des cas de PB (n=60) avec les témoins sans PB (n=30)

	Total de l'échantillon (n=90)	Pemphigoïde bulleuse		Valeur de p*
		Oui (n=30)	Non (n=60)	
Caractéristiques cliniques et démographiques				
Age, années	83,0±6,6	83,0±6,8	83,0±6,6	0,973
Sexe féminin, n (%)	60 (66,7)	21 (67,7)	39 (66,1)	0,875
Indice de masse corporelle, kg/m ²	26,6±6,4	25,5±4,9	27,2±7,0	0,215
Nombre de maladies chroniques	5,1±2,5	5,2±2,3	5,1±2,6	0,797
Score S-MMSE, /6	3,8±1,9	3,5±2,1	3,9±1,8	0,259
Mesures environnementales et fonctionnelles				
Score IADL, /4	1,9±1,5	1,7±1,6	2,0±1,5	0,297
Exposition solaire, n (%)	36 (40,0)	11 (35,5)	25 (42,4)	0,526
Saison lors de l'inclusion				0,992
Printemps, n (%)	12 (13,3)	4 (12,9)	8 (13,6)	-
Été, n (%)	24 (26,7)	8 (25,8)	16 (27,1)	-
Automne, n (%)	24 (26,7)	8 (25,8)	16 (27,1)	-
Hiver, n (%)	30 (33,3)	11 (35,5)	19 (32,2)	-
Mesures biologiques				
Vitamine D				
Concentration 25-hydroxyvitamine D, nmol/L	33,0±18,8	29,6±17,1	34,8±19,6	0,211
Concentration hormone parathyroïde PTH, pg/mL	43,2±49,3	36,4±24,4	46,5±57,7	0,378

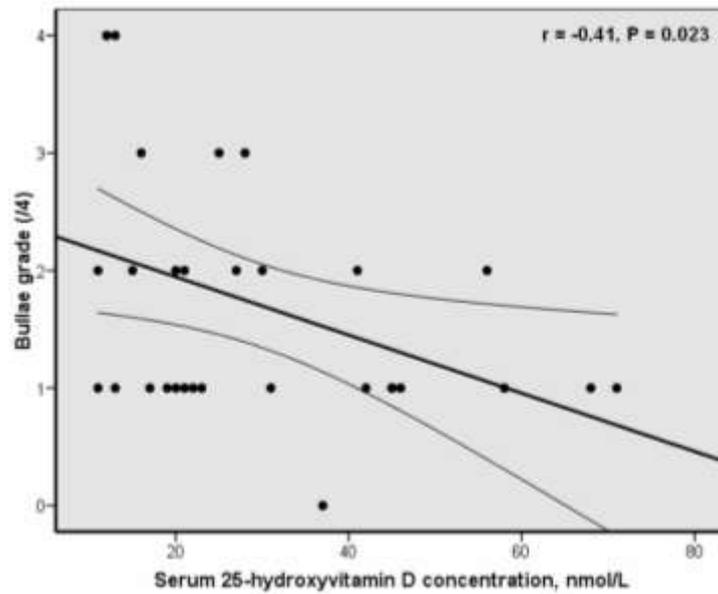
Données présentées : moyennes avec déviation standard selon les cas. IADL : Instrumental Activities of Daily Living ; PTH : hormone parathyroïde ; S-MMSE : Short version of Mini-Mental State Examination ; *: Comparaison entre les témoins et les patients avec PB basée sur le test de Chi2 ou le test de Student, selon les cas.

Tableau 2. Régression logistique en uni et multi varié entre des taux élevés de vitamine D* et une PB, ajustée sur les potentiels facteurs de confusion (n=30).

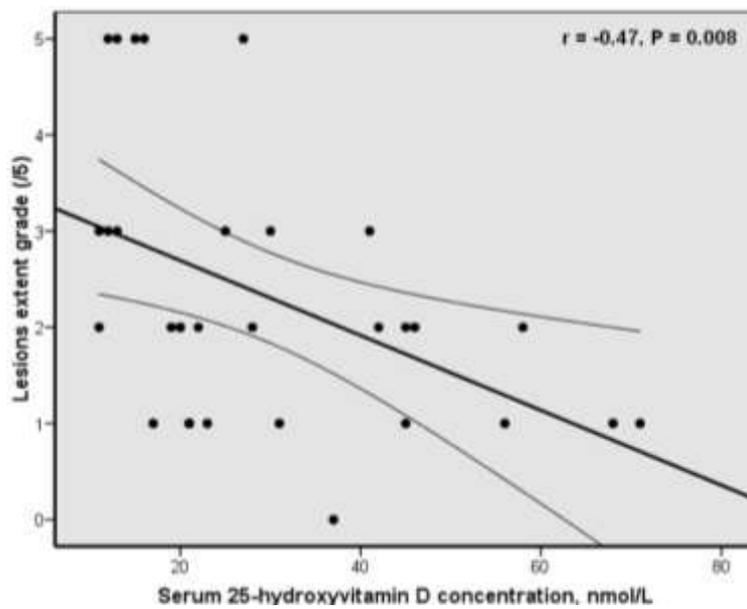
Pemphigoïde bulleuse								
	Modèle 1		Modèle 2		Modèle 3		Modèle 4	
	Non ajusté OR [95%CI]	Valeur de p	Ajusté OR [95%CI]	Valeur de p	Ajusté OR [95%CI]	Valeur de p	Totalement ajusté OR [95%CI]	Valeur de p
Taux élevé de vitamine D*	0,30	0,049	0,245	0,029	0,25	0,030	0,26	0,044
	[0,09;0,99]		[0,07;0,86]		[0,07;0,87]		[0,07;0,96]	
Age	1,00	0,972	0,96	0,302	0,95	0,257	0,95	0,248
	[0,94;1,07]		[0,89;1,04]		[0,88;1,04]		[0,87;1,04]	
Sexe féminin	1,08	0,875	1,21	0,704	1,20	0,737	1,49	0,487
	[0,43;2,72]		[0,45;3,29]		[0,42;3,44]		[0,48;4,59]	
Indice de masse corporelle	0,95	0,216	0,94	0,146	0,94	0,150	0,96	0,333
	[0,88;1,03]		[0,86;1,02]		[0,86;1,02]		[0,88;1,05]	
Nombres de maladies chroniques	1,02	0,794	1,12	0,299	1,11	0,325	1,14	0,244
	[0,86;1,22]		[0,91;1,38]		[0,90;1,38]		[0,91;1,42]	
score S-MMSE	0,88	0,257	0,85	0,191	0,89	0,516	0,90	0,556
	[0,70;1,10]		[0,66;1,09]		[0,63;1,27]		[0,62;1,29]	
score IADL	0,86	0,294	-		0,89	0,645	0,86	0,572

	[0,64;1.14]			[0,53;1,49]		[0,51;1,45]	
Exposition solaire	0,75	0,527	-	1,11	0,859	1,39	0,599
	[0,30;1,84]			[0,34;3,66]		[0,41;4,72]	
Saison lors de l'inclusion	1,06	0,799	-	1,09	0,718	0,97	0,909
	[0,70;1,60]			[0,69;1,72]		[0,60;1,57]	
PTH	1,00	0,387	-	-		0,99	0,304
	[0,98;1,01]					[0,98;1,01]	

Modèle 1: régression non ajustée; Modèle 2: ajustement pour les caractéristiques cliniques et démographiques (âge, sexe, indice de masse corporelle, nombre de maladies chroniques, et le score S-MMSE); Modèle 3: Modèle 2 + ajustement sur les mesures environnementales et fonctionnelles (score IADL, exposition solaire et saison lors de l'inclusions); Modèle 4: Modèle 3 + ajustement sur les mesures biologiques (PTH); IC: intervalle de confiance; IADL: Instrumental Activities of Daily Living; S-MMSE: Short Mini-Mental State Examination; OR: odds ratio; *: concentration de 25-hydroxyvitamine D \geq 49 nmol/L; OR statistiquement significatif en gras.



(A)



(B)

Figure 15. Relation entre le taux de 25OHD et la sévérité de la pemphigoïde bulleuse parmi les 30 cas: (A) grade de bulles ; (B) étendue de la pemphigoïde bulleuse. La ligne noire épaisse est la droite de régression linéaire, et les lignes fines au-dessus et en-dessous correspondent à l'intervalle de confiance de 95%.

VIII. Discussion

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre le taux moyen de 25OHD chez les patients PB comparé aux témoins sans PB, bien que les patients avec PB avaient des taux plus bas. Néanmoins, en analyse post-hoc, nous avons retrouvé que les patients atteints de PB avaient moins souvent un taux élevé de 25OHD que les témoins sans PB. Enfin, chez les cas de PB, les taux élevés de 25OHD étaient corrélés à une diminution de la sévérité de la PB (nombre de bulles et étendue de la maladie).

Dans notre étude, l'ensemble des personnes âgées hospitalisées de plus de 70 ans avait un statut vitaminique D « suboptimal », c'est-à-dire inférieur à 50 nmol/L. Un grand nombre d'études menées sur tous les continents soulignent la prévalence élevée de l'hypovitaminose D (90). Un taux de 25OHD moyen de 21,6 ng/mL a été trouvé dans une méta-analyse reprenant 394 études portant sur le statut vitaminique D de sujets sains (91).

Notre étude a montré que la majorité des patients PB avaient une carence en vitamine D, c'est-à-dire un taux inférieur à 25 nmol/L.

De nombreuses études épidémiologiques descriptives ont montré qu'un taux élevé de 25OHD était protecteur vis-à-vis des maladies auto-immunes, à l'origine d'une amélioration clinique, voir d'une réduction de risque de la survenue de la maladie (82-85). Seules 2 études (92,93) se sont intéressées spécifiquement à la relation entre concentration sérique de 25OHD et PB, en analysant la relation entre déficit en 25OHD et PB. En 2012, Marzano et al. ont montré que 15 patients âgés de 66,9 ans en moyenne (rang : 48 à 96 ans) atteints de PB présentaient des concentrations sérique de 25OHD plus basses que 15 témoins appariés sur l'âge, le sexe

et l'IMC (92). Néanmoins, les différentes limites de cette étude empêchaient de conclure de façon définitive quant à l'implication de l'hypovitaminose D dans le processus de PB, notamment en l'absence d'autres travaux répliquant ces résultats. En particulier, de potentiels facteurs de confusion n'avaient pas été pris en compte dans cette étude tels que l'état de fragilité, l'état cognitif, l'autonomie, ainsi que la concentration sérique de PTH. A titre d'illustration, il a été proposé que les effets non-osseux de l'hypovitaminose D puissent être expliqués, non pas seulement par la diminution des concentrations de 25OHD, mais plutôt par l'augmentation concomitante des concentrations sériques de PTH (94). Il convient donc de considérer ces différentes co-variables lorsque l'on examine l'association entre hypovitaminose D et PB. De plus, l'âge moyen de l'ensemble de leurs patients PB était inférieur à 70 ans, un des critères diagnostiques de la PB (20), ce qui démontre que leur échantillon de population PB n'est pas le reflet de la pathologie dans la population générale. En complément de Marzano et al. (92), Tukaj et al. ont par la suite publié des résultats divergents ne rapportant aucune différence significative entre le taux de vitamine D chez 12 patients atteints de PB et 32 témoins, appariés sur l'âge et le sexe (93). Outre la petite taille de l'échantillon, de nombreux facteurs de confusion n'ont également pas été pris en compte dans cette deuxième étude.

En comparaison, notre étude a inclus un nombre plus important de participants et s'est intéressée, à la différence des 2 autres, à la relation entre taux élevé de 25OHD chez les patients souffrant de PB, en ajustant sur l'ensemble des potentiels facteurs de confusion. Par ailleurs, il s'agit de la première étude à avoir retrouvé un lien entre la sévérité de la PB et le taux de vitamine D.

Pour expliquer la relation entre PB et 25OHD, il est important de comprendre par quels

mécanismes la PB pourrait influencer, ou à l'inverse, être influencée, par la 25OHD.

La PB est une maladie chronique qui touche plus fréquemment les personnes âgées de plus de 70 ans, souvent atteints de maladies neurologiques ou neuropsychiques. Comme on le retrouve dans la littérature (1,12), notre étude note un âge moyen des patients PB autour de 83 ans. Du fait de l'âge, de la maladie et des pathologies neurologiques associées, les patients sont pour la plupart dépendants pour les actes de la vie quotidienne évoluant vers un état de grabatisation. Par conséquent, cette perte d'autonomie est associée à une exposition solaire moindre et à un accès limité à une nourriture riche en vitamine D, pouvant expliquer la carence en 25OHD.

Cependant, notre étude s'est intéressée à des patients pour lesquels a été porté un primo-diagnostic de PB, ce qui sous-entend que la maladie est d'évolution récente, sans retentissement sur la perte d'autonomie et l'indépendance. En effet, les résultats de notre étude montrent bien qu'il n'y a pas de différence significative entre les patients avec une PB et les témoins sur l'étude de l'exposition solaire, l'état nutritionnel (IMC), l'autonomie (score IADL) ou la mémoire (score S-MMSE). Ainsi, il est peu probable que la PB joue un rôle sur le taux de 25OHD, mais plus vraisemblablement l'inverse. Les mécanismes physiopathologiques et notamment la mise en jeu des voies immunitaires humorales et cellulaires peuvent expliquer en partie cette relation.

Des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension de la physiopathologie de la PB. D'une part, on sait que des clones plasmocytaires sécrètent des anticorps anti-membrane basale de l'épiderme responsables de l'activation du complément, amenant à la libération de cytokines inflammatoire et du recrutement de cellules inflammatoires, responsables du clivage dermo-épidermique (18). D'autre part, il a été mis en évidence, plus récemment, une population lymphocytaire Th17 augmentée et une diminution de la population lymphocytes T

régulateurs chez les patients porteurs d'une PB (55-57).

Il s'avère que la vitamine D a démontré une influence sur certaines de ces voies immunitaires mises en jeu dans la PB. En effet, la vitamine D a montré au cours de la dernière décennie des effets extra-osseux sur l'ensemble des tissus organiques dotés de VDR (13-16). En particulier, il a été rapporté que l'hypovitaminose D était impliquée dans la physiopathologie de différentes maladies auto-immunes (95). Via son action sur les M-DC, le calcitriol induit à partir de lymphocytes T naïfs la différenciation de lymphocytes T régulateurs exprimant Foxp3 et de lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 et réprime la différenciation en LTh1 et Th17. Le calcitriol exerce une action directe sur les lymphocytes T : il diminue l'expression d'interféron- α et d'IL-17, cytokines effectrices des réponses Th1 et Th17 respectivement, diminue l'activation lymphocytaire, favorise l'émergence de lymphocytes T régulateurs et augmente la synthèse d'IL10 (81).

Ainsi, par son action sur le système immunitaire cellulaire (diminution des lymphocytes T régulateurs et une augmentation de la population lymphocytaire Th17) l'hypovitaminose D serait à l'origine d'un déséquilibre immunitaire pouvant favoriser la survenue de PB (mise en évidence récemment d'une diminution de la population lymphocytes T régulateurs et d'une augmentation de la population lymphocytaire Th17 chez les PB).

Notre étude présente un certain nombre de limites. D'une part, il s'agit d'une étude cas-témoins, ce qui ne permet pas d'établir un lien de causalité entre la PB et la 25OHD.

Notre étude a également inclus un échantillon limité de patients âgés de plus de 70 ans (n=30), ce qui explique peut être l'absence de différence significative entre le taux moyen de 25OHD chez les patients PB comparé aux témoins sans PB. Par ailleurs, il faut noter que 5 patients avec PB (soit 14,3% de l'effectif indicent de patients identifiés au cours de la période

de l'étude) n'ont pu être inclus dans l'étude car ayant reçu une supplémentation. Ce résultat soulève la question de leur taux sérique pour tenter de comprendre la survenue de PB. Soit ces patients n'étaient pas assez supplémentés et de ce fait encore carencé. Ils avaient de ce fait un profil identique aux patients recrutés. Soit ils avaient un taux normalisé de 25OHD. Dans ce dernier cas, la survenue de la PB pourrait s'expliquer par la chronicité de la carence, cette dernière pouvant entraîner des perturbations plus profondes non corrigibles à court et moyen terme en terme de processus dysimmunitaire.

Nous avons réalisé une partie de nos analyses statistiques à visée exploratoire, en étudiant une hypothèse (relation entre PB et taux élevé de 25OHD) formulée postérieurement à la fin de l'étude. Néanmoins, même si la valeur de cette analyse post-hoc est limitée, elle suggère que le risque de PB est moins important en cas de taux élevés en 25OHD. De plus, notre étude est, à notre connaissance, la première à analyser la relation entre ces 2 entités sur un nombre aussi important de patients, en prenant en compte autant de facteurs de confusion, et en appariant sur l'âge, le sexe, la couleur de peau et la saison.

Enfin, notre étude est monocentrique et a recruté uniquement des patients hospitalisés, ce qui n'est pas représentatif de la population générale. Néanmoins, le diagnostic et la prise en charge de la primo-PB sont habituellement effectués en hospitalisation. En outre, il nous est apparu nécessaire de recruter les patients dans un seul et même centre pour centraliser le dosage de la 25OHD et éviter ainsi au maximum d'éventuelles variations de laboratoire.

IX. Conclusion

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre le taux moyen de 25OHD chez les patients PB comparé aux témoins sans PB, bien que leur taux de 25OHD soit plus bas. Notre étude a régalement révélé que les patients atteints de PB avaient moins fréquemment un taux élevé de 25OHD que les témoins. Dans la littérature, il a été rapporté qu'un taux sérique élevé de 25OHD protégeait de la survenue de maladies auto-immunes. De la même façon, les résultats de notre étude montrent qu'elle pourrait être impliquée dans l'histoire naturelle de la PB, notamment par la mise en jeu des lymphocytes Th17 et T régulateurs. Par ailleurs, chez les patients atteints de PB, les taux élevés de 25OHD étaient associés à une sévérité moins importante (nombre de bulle, et étendue de la maladie). Compte tenu de ces résultats, nous suggérons qu'une supplémentation en vitamine D pourrait limiter la sévérité de la maladie. Des essais cliniques bien conduits de grande ampleur sont nécessaires pour examiner la relation entre vitamine D et PB avec un niveau de preuve plus élevé.

X. Références bibliographiques

- 1) Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 266-268.
- 2) Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot MF, Saiag P, Tancrede-Bohin E et al. Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Arch Dermatol* 2005; 141: 691-698.
- 3) Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E et al. Bullous diseases French study group. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with BP. *N Engl J Med* 2002; 31: 321-327.
- 4) Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Delaporte E, D'Incan M, Dreno B et al. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with BP: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1681-1687.
- 5) Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1998; 134: 465-469.
- 6) Bernard P, Enginger V, Venot J, Bedane C, Bonnetblanc JM. Survival prognosis in pemphigoid: a cohort of 78 patients. *Ann Dermatol Venereol* 1995; 122: 751-757.
- 7) Joly P. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *BMJ* 2008; 337: 209
- 8) Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris - incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; 9: 337.

- 9) Foureur N, Mignot S, Senet P, Verpillat P, Picard-Dahan C, Crickx B et al. Corrélation entre la présence d'anticorps antiantigène de type 2 de la pemphigoïde bulleuse et démence chez les sujets âgés sans manifestation clinique de pemphigoïde bulleuse. *Ann Dermatol Venereol* 2006; 133: 439-443.
- 10) Bastuji-Garin S, Lemordant P, Bonnetblanc JM, Bédane C, Joly P, Delaporte E et al. Etude épidémiologique prospective des facteurs de risque de la pemphigoïde. *Ann Dermatol Venereol* 2007; 134: S7.
- 11) Leung CL, Zheng M, Prater SM, Liem RK. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 2001; 154: 691-697.
- 12) Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.
- 13) Annweiler C, Schott AM, Berrut G, Chauviré V, Le Gall D, Inzitari M et al. Vitamin D and ageing: neurological issues. *Neuropsychobiology*. 2010; 62: 139-150.
- 14) Annweiler C, Allali G, Allain P, Bridenbaugh B, Schott AM, Kressig RW et al. Vitamin D and cognitive performance in adults: a systematic review. *Eur J Neurol*. 2009; 16: 1083-1089.
- 15) Bouvard B, Annweiler C, Sallé A, Beauchet O, Chappard D, Audran M et al. Extraskeletal effects of vitamin D: facts, uncertainties, and controversies. *Joint Bone Spine* 2011; 78: 10-16.
- 16) Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function. *Vitam Horm* 2011; 86: 1-21.
- 17) Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol* 1995; 131: 48-52.
- 18) Doffoel-Hantz V, Cogné M, Drouet M, Sparsa A, Bonnetblanc JM, Bédane C. Physiopathologie de la pemphigoïde bulleuse. *Ann Dermatol* 2009; 136: 740-747.

- 19) Tanaka T, Parry DA, Klaus-Kovtun V, Steinert PM, Stanley JR. 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* 1991; 266: 12555-12559.
- 20) 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: 1075-1080.
- 21) Bernard P, Venot J, Constant F, Bonnetblanc JM. Blood eosinophilia as a severity marker for bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1987; 16: 879-881.
- 22) Strohal R, Rappersberger K, Penamberger H, Wolff K. Nonbullous pemphigoid: prodrome of bullous pemphigoid or a distinct pemphigoid variant? *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 293-299.
- 23) Lamb PM, Abell E, Tharp M, Frye R, Deng JS. Prodromal Bullous Pemphigoid? *Int J Dermatol* 2006; 45: 209-214.
- 24) Levine N, Freilich A, Barland, P. Localized pemphigoid simulating dyshidrosiform dermatitis. *Arch Dermatol* 1979; 115: 320-321.
- 25) Schmidt E, Sitaru C, Shubert B, Wesselmann U, Kromminga A, Bröcher EB et al. subacute prurigo variant of bullous pemphigoid : autoantibodies show the same specificity compared with classic bullous pemphigoid. *J Am Acad Dematol* 2002; 47: 133-136.
- 26) Cordel N, Courville P, Martel P, Musette P, Joly P. Extensive erosive bullous pemphigoid: an atypical and serious clinical variant. *Br J Dermatol* 2002; 147: 537-539.
- 27) Person JR, Rogers RS. Bullous and cicatricial pemphigoid. Clinical, histopathologic, and immunopathologic correlations. *Mayo Clin Proc* 1977; 52: 54-66.

- 28) Courville P, Kupfer I, Gilbert D, Thomine E, Metayer J, Joly P. Evaluation of histological criteria for bullous pemphigoid. Correlations with antigens recognized by immunoblotting of anti-epidermal autoantibodies. *Ann Pathol* 2000; 20: 546-569.
- 29) Chaidemenos GC, Maltezos E, Chrysomallis F, Kouskoukis K, Kapetis E, Mourellou O et al. Value of routine diagnostic criteria of bullous pemphigoid. *Int J Dermatol* 1998; 37: 206-210.
- 30) Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E et al. French Study Group for Bullous Diseases. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 637-643.
- 31) Cordel N, Chosidow O, Hellot MF, Delaporte E, Lok C, Vaillant L et al. French Study Group of Bullous Diseases. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. *Dermatology* 2007; 215: 187-191.
- 32) Langan SM, Groves RW, West J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 631-636.
- 33) Bastuji-Garin S, Joly P, Picard-Dahan C, Bernard P, Vaillant L, Pauwels C et al. Drugs associated with bullous pemphigoid. A case-control study. *Arch Dermatol* 1996; 132: 272-276.
- 34) Aouidad I, Fite C, Marinho E, Deschamps L, Crickx B, Descamps V. A case report of bullous pemphigoid induced by dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *JAMA Dermatol* 2013; 149: 243-245.
- 35) Korman NJ. Bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1987; 16: 907-924.
- 36) Laffitte E, Borradori L. Bullous pemphigoid and related disorders. In : Hertl M. (ed.) *Autoimmune diseases of the skin*, Wien-New York : Springer Verlag, 2005: 71-93.
- 37) Selby L, De Castro F, De Villiers WJ. The association of bullous pemphigoid and

- ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 176-170.
- 38) Marcet B, Sibaud V, Geniaux M, Taieb A. Pemphigoïde bulleuse, cirrhose biliaire primitive et vitiligo : un syndrome auto-immun multiple ? *Ann Med Interne*. 2002; 153: 349-350.
- 39) Tirado-Sanchez A, Montes-de-Oca G. Coexistence of bullous pemphigoid, vitiligo, and thyroid disease: a multiple autoimmune syndrome? *Dermatol Online J* 2005; 11: 20.
- 40) Fiorucci MC, Cozzani E, Casu M, Murialdo G, Parodi A, Rebora A. Bullous pemphigoid and Graves' disease: an association between skin and thyroid autoimmunity. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 56-51.
- 41) Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P et al. BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1413-1422.
- 42) Humbert P, Dupond JL. The multiple autoimmune syndromes (MAS). *Br J Dermatol* 1997; 136: 468-469.
- 43) Taylor G, Venning V, Wojnarowska F, Welch K. Bullous pemphigoid and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 181-184.
- 44) Nakatani C, Muramatsu T, Shirai T. Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins. *Br J Dermatol* 1998; 139: 365-370.
- 45) Leyendeckers H, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, Zillikens D, Sitaru C, Schmitz J et al. Memory, B cells specific for the NC16A domain of the 180 kDa bullous pemphigoid autoantigen can be detected in peripheral blood of bullous pemphigoid patients and induced in vitro to synthesize autoantibodies. *J Invest Dermatol* 2003;

120: 372-378.

- 46) Skaria M, Jaunin F, Hunziker T, Riou S, Schumann H, Bruckner- Tuderman L et al. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOHterminus of BP230. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 998-1004.
- 47) Dahl MV, Falk RJ, Carpenter R, Michael AF. Deposition of the membrane attack complex of complement in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 132-135.
- 48) Nelson KC, Zhao M, Schroeder PR, Li N, Wetsel RA, Diaz LA et al. Role of different pathways of the complement cascade in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 2006; 116: 2892-2900.
- 49) Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL et al. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1995; 95: 1539-1544.
- 50) Di Zenzo G, Marazza G, Borradori L. Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol* 2007; 23: 257-288.
- 51) Lin MS, Fu CL, Giudice GJ, Olague-Marchan M, Lazaro AM, Stastny P et al. Epitopes targeted by bullous pemphigoid T lymphocytes and autoantibodies map to the same sites on the bullous pemphigoid 180 ectodomain. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 955-961.
- 52) Budinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H et al. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 1998; 102: 2082-2089.
- 53) Zillikens D, Ambach A, Schuessler M, Dummer R, Hartmann AA, Burg G. The interleukin-2 receptor in lesions and serum of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 141-145.

- 54) Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98: 279-285.
- 55) Toosi S, Bystryjn JC. Potential role of interleukin-17 in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *Med Hypotheses* 2010; 74: 727-728.
- 56) Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, Hamada T, Karashima T, Nakama T et al. Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 2011; 20: 1022-1024.
- 57) Lo Schiavo A, Ruocco E, Brancaccio G, Caccavale S, Ruocco V, Wolf R. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2013; 31: 391-399.
- 58) Bernard P, Bedane C, Prost C, Ingen-Housz-Oro S, Joly P. Recommandations des centres de référence des maladies bulleuses auto-immunes pour le diagnostic et la prise en charge de la pemphigoïde bulleuse. *Ann Dermatol Venereol* 2011; 138: 247-251.
- 59) Annweiler C, Schott AM, Berrut G, Fantino B, Beauchet O. Vitamine D-related changes in physical performance: a systematic review. *The journal of nutrition, health and Aging* 2009; 13: 893-898.
- 60) Zhou C, Assem M, Tay JC, Watkins PB, Blumberg B, Schuetz EG et al. Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 2006; 116: 1703–1712.
- 61) Annweiler C, Souberbielle JC, Schott AM, de Decker L, Berrut G, Beauchet O. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 2011; 9: 259-267.
- 62) Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D. New clues about vitamin D functions in nervous system. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2002; 13: 100-105.

- 63) Miller WL, Portale AA. Vitamin D 1 alpha-hydroxylase. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 2000; 11: 315-319.
- 64) Norman AW. From Vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. The American Journal of clinical nutrition 2008; 88: 491S-499S.
- 65) Somjen D, Weisman Y, Kohen F, Gayer B, Limor R, Sharon O et al. 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. Circulation 2005; 111: 1666-1671.
- 66) Perterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology. European journal of clinical nutrition 2009; 63: 1377-1386.
- 67) Cannell JJ, Hollis BW. Use of Vitamin D in clinical practice. Altern Med Rev 2008; 13: 6-20.
- 68) Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Welhing M. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacological reviews 2000; 52: 513-556.
- 69) Montero-Odasso M, Duque G. Vitamin D in the aging musculoskeletal system: an authentic strength preserving hormone. Molecular aspects of medicine 2005; 26: 203-219.
- 70) Cormier C, Souberbielle JC. New definition of optimal vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range. La revue de médecine interne 2006; 27: 684-689.
- 71) Basha B, Rao DS, Han ZH, Parfitt AM. Osteomalacia due to vitamin D depletion: a neglected consequence of intestinal malabsorption. The American Journal of medicine

2000; 108: 296-300.

- 72) Bischoff-Ferrari HA, Giovannuci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hugues B. estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American Journal of clinical nutrition* 2006; 84: 18-28.
- 73) Dawson-Hugues B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005; 26: 203-219.
- 74) Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29: 726–776.
- 75) Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 685–698.
- 76) Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1137–1142.
- 77) Adorini L, Penna G. Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists. *Handb Exp Pharmacol* 2009: 251–273.
- 78) Unger WW, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol* 2009; 39: 3147–3159.
- 79) Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4 + Foxp3+ regulatory T-cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 2005; 106: 3490–3497.
- 80) Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T-cells expressing CTLA-4 and

- FoxP3. *J Immunol* 2009; 183: 5458–5467.
- 81) Schoindre Y, Terrier B, Kahn JE, Saadoun D, Souberbielle JC, Benveniste O et al. Vitamin D and autoimmunity. First part: Fundamental aspects. *Rev Med Interne* 2012; 33: 80-86.
- 82) Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006; 296: 2832-2838.
- 83) Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, Stanevsky A, Kamen DL, Marinescu LM et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2010;5:e9193.
- 84) Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1137–1142.
- 85) Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15: 2579–2585.
- 86) Haubois G, Annweiler C, Launay C, Fantino B, de Decker L, Allali G, Beauchet O. Development of a short form of Mini-Mental State Examination for the screening of dementia in older adults with a memory complaint: a case control study. *BMC Geriatr* 2011; 11: 59.
- 87) Annweiler C, Schott AM, Beauchet O. Proposal and validation of a quick question to rate the influence of sun exposure in geriatric epidemiological studies on vitamin D. *Int J Vitam Nutr Res* 2012; 82: 412-416.
- 88) Pérès K, Chrysostome V, Fabrigoule C, Orgogozo JM, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Restriction in complex activities of daily living in MCI: impact on outcome. *Neurology* 2006; 67: 461-466.
- 89) Rochon J, Gondan M, Kieser M. To test or not to test: Preliminary assessment of normality when comparing two independent samples. *BMC Med Res Methodol* 2012,

12, 81.

- 90) Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 2009; 20: 1807–1820.
- 91) Hagenau T, Vest R, Gissel TN, Poulsen CS, Erlandsen M, Mosekilde L et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int* 2009; 20: 133-40.
- 92) Marzano AV, Trevisan V, Eller-Vainicher C, Cairoli E, Marchese L, Moreli V et al. Evidence for vitamin D deficiency and increased fractures' prevalence in autoimmune bullous skin diseases. *BJD* 2012; 167:688-691.
- 93) Tukaj S, Schmidt E, Recke A, Ludwig RJ, Zillikens D, Tukaj C, Kasperkiewicz M. Vitamin D status in bullous pemphigoid patients. *BJD* 2013; 168: 873-874.
- 94) Annweiler C, Le Gall D, Fantino B, Beauchet O, Tucker KL, Buell JS. 25 hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology* 2010; 6: 75-95.
- 95) Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10: 482-496.

XI. Table des matières

I.	Introduction	16
II.	La pemphigoïde bulleuse.....	18
	2.1 Epidémiologie	18
	2.2 Physiopathologie : cible antigénique des autoanticorps	18
	2.2.1 Antigène BPAG1 (bullous pemphigoid antigen 1) ou BP230	19
	2.2.2 Antigène BPAG2 (bullous pemphigoid antigen 2) ou BP180	20
	2.3 Critères diagnostiques	21
	2.3.1 Critères cliniques	21
	2.3.2 Critères histologiques	25
	2.3.3 Critères immunologiques	26
	2.4 Facteurs de risque	27
	2.4.1 L'âge	27
	2.4.2 Pathologies neurologiques	27
	2.4.3 Médicaments	27
	2.4.4 Association à des maladies auto-immunes	27
	2.5. Pemphigoïde bulleuse et auto-immunité.....	29
	2.5.1 La réponse immune à médiation humorale.....	29
	2.5.2 La réponse immune à médiation cellulaire	30
	2.6 Traitement de la pemphigoïde bulleuse.....	32
III.	Vitamine D	33
	3.1 Métabolisme et mode d'action de la vitamine D	33
	3.2 Mode d'action.....	35
	3.3 Le statut vitaminique D	35
	3.4 Action de la vitamine D sur les voies immunitaires	37
	3.5 Vitamine D et auto-immunité.....	40
IV.	Hypothèse.....	42

V.	Objectifs	42
5.1	Objectif primaire.....	42
5.2	Objectif secondaire	42
VI.	Matériels et méthodes.....	43
6.1	Participants :	43
6.1.1	Critères d'inclusion.....	43
6.1.2	Critères de non inclusion :.....	43
6.1.3	Méthode d'appariement :	43
6.2	Pemphigoïde bulleuse.....	44
6.2.1	Méthode diagnostique.....	44
6.2.2	Evaluation de la sévérité.....	44
6.3	Concentration sérique de 25OHD	45
6.4	Potentiels facteurs de confusion	45
6.5	Analyse statistique.....	46
6.5	Approbation du protocole et consentements	47
VII.	Résultats	48
7.1	Résultats principaux	48
7.2	Analyse complémentaire post-hoc.....	49
VIII.	Discussion.....	58
IX.	Conclusion.....	63
X.	Références bibliographiques.....	64
XI.	Table des matières	75
XII.	Annexe.....	77

XII. Annexe

Cette thèse a fait l'objet d'un article, soumis dans la revue *Journal of Investigative Dermatology*.

**Serum 25-hydroxyvitamin D concentration in patients with bullous pemphigoid:
a case-control study**

Marie-Elodie Sarre, MD, BS ¹

Ludovic Martin, MD, PhD ¹

Erick Legrand, MD, PhD ²

Cédric Annweiler, MD, PhD ^{3,4}

Olivier Beauchet, MD, PhD ³

1: Department of Dermatology, UNAM, Angers University Hospital, Angers, France; 2: Department of Rheumatology, UNAM, Angers University Hospital, Angers, France; 3: Department of Internal Medicine and Geriatrics, UPRES EA 4638, UNAM, Angers University Hospital, Angers, France; 4: Robarts Research Institute, the University of Western Ontario, London, ON, Canada.

Correspondence to: Marie-Elodie Sarre, Department of Dermatology, UNAM, Angers University Hospital, 4 rue Larrey, 49 933 cedex 09, France; e-mail: marieelodie.sarre@gmail.com; Phone: +33 (6) 95 49 50 42; Fax: +33 (2) 41 35 54 54

Title character count: 97; **Abstract word count:** 229; **Word count:** 2347; **Table count:** 2;

Figure count: 1; **Reference count:** 30

Short title: Link between bullous pemphigoid and Vitamin D (45 characters)

Key words: vitamin D; bullous pemphigoid; auto-immunity; elderly

Abbreviations:

BP: bullous pemphigoid

25OHD: 25-hydroxyvitamin D

BMI: body mass index

OR: odds ratio

CI: confidence interval

VDR: Vitamin D Receptor

PTH: parathyroid hormone

SMMSE: Short Mini-Mental State Examination

IADL: instrumental activities of daily living

M-DC: myeloid dendritic cells

IL: Interleukin

ABSTRACT

Background. Bullous pemphigoid (BP) is a chronic autoimmune skin disease. Previous data suggest that higher vitamin D status may regulate autoimmunity and prevent from autoimmune disease.

Objectives. To determine in elderly inpatients whether i) the existence of a vitamin D deficiency was more frequently found in BP patients than in controls ii) among BP cases, to assess whether the severity of BP was associated with the 25 hydroxyvitamin D (25OHD)

Methods. Thirty consecutive inpatients with a *de novo* diagnosis of BP and 60 age-, gender-, skin complexion- and season-matched controls were included in this case-control study. BP severity was graded using number of bullae (grade 0-4, worse) and lesions extent (grade 0-5, worse). Higher vitamin D status was defined as the upper quartile of serum 25OHD concentration (i.e., $25\text{OHD} \geq 49\text{nmol/L}$) versus the others combined. Age, gender, BMI, chronic diseases, cognition IADL score, sun exposure at midday, season of evaluation, and serum parathormone concentration were investigated as potential cofounders.

Results. There were no significant difference between the mean 25OHD concentration in BP patients (29.6 ± 17.1) compared to controls without PB (34.8 ± 19.6) ($p = 0.211$). Higher vitamin D, defined as the upper quartile of serum 25OHD concentration (i.e., $25\text{OHD} \geq 49\text{nmol/L}$), was associated with fewer BP (fully adjusted OR=0.26, P=0.044). Among BP cases, 25OHD concentration correlated inversely with the severity of the disease ($r = -0.41$ with $P = 0.023$ for bullae grade; $r = -0.47$ with $P = 0.008$ for lesions extent grade).

Conclusion. Higher vitamin D status was inversely associated with BP diagnosis and severity. These findings provide a scientific rationale to investigate the role of vitamin D as an adjuvant treatment in BP replacement trials.

INTRODUCTION

Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune subepidermal blistering disease that occurs most commonly after 70 years of age (Jung M et al., 1999). BP is a public health issue in older adults due to its high incidence estimated at 20 new cases per 1,000,000 persons per year (Joly P 2008; Langan SM et al. 2008), the coexistence of cognitive disorders (Foureur N et al. 2006; Bastuji-Garin S et al. 2007; Leung CL, et al. 2001), and a high mortality rate around 31-41% in treated patients in the first year (Joly P, et al., 2009). It justifies developing prevention strategies of BP. However, such an objective cannot be achieved without first understanding the immunopathogenic mechanisms of BP, which remain to date not fully elucidated.

Among the biological determinants likely to influence autoimmunity in the elderly is vitamin D serum level. With advancing age, a decreasing proportion of older adults are able to maintain high vitamin D status (from 50% at 60 years of age to less than 20% after 90 years of age) (Holick MF, 2007). The clinical relevance is that vitamin D effects are not restricted to bone, but target a large number of non-bone processes including the immune system and the maintenance of self tolerance (Annweiler C et al. 2010; Annweiler C et al. 2009; Bouvard B et al. 2011; Bikle DD 2011). As an illustration, higher vitamin D status has been associated with risk reduction and clinical improvement of autoimmune disorders such as lupus, multiple sclerosis (Munger KL et al. 2006; Ben-Zvi I, et al. 2010). We hypothesized that low 25 hydroxyvitamin D (25OHD) serum concentration is associated with BP in the elderly.

The objectives of this case-control study were to determine in elderly inpatients whether i) the existence of a vitamin D deficiency was more frequently found in BP patients than in controls ii) among BP cases, to assess whether the severity of BP was associated with the 25OHD.

METHODS

Participants

Thirty consecutive inpatients with a *de novo* diagnosis of active BP in the Dermatology Department of the University Hospital of Angers, France, between November 2012 and February 2014, were enrolled in this study. Sixty controls matched on age, gender, skin complexion and season of evaluation were selected from other inpatients in the same Department. Inpatients with other bullous diseases or having used vitamin D supplements within the 3 past months were not included.

Bullous pemphigoid

The diagnosis of active BP was suspected on clinical criteria that consisted of chronic bullous disease in combination with age greater than 70 years, no atrophic scars, no mucosal involvement and no predominant bullous lesions on the neck and head (Vaillant L et al, 1998). This clinical diagnosis was further confirmed by skin histology (Person JR and Rogers RS. 1977; Courville P et al. 2000) and direct immunofluorescence (Courville P et al. 2000; Chaidemenos GC et al. 1998). The severity of BP was graded based on the number of bullae and lesions extent. The mean number of bullae was estimated during the first 3 days of hospitalization, and graded as follows: grade 1 for 0-5 bullae; grade 2 for 6-20 bullae; grade 3 for 21-50 bullae; and grade 4 for more than 50 bullae. Lesions extent was graded from 0 to 5 (worst) based on the number of body parts affected by the disease, among the following: lower limbs, upper limbs, back, trunk, and pelvis.

Higher vitamin D status

Fasting early morning venous blood was collected on the day of inclusion (i.e., before BP treatment) from resting inpatients. Serum 25OHD level was measured by radioimmunoassay (DiaSorin Inc., Stillwater, MN). With this method, there is no lipid interference, which is

often observed in other non-chromatographic assays of serum 25OHD concentrations. The intra- and interassay precision were 5,2% and 11,3% respectively (range 30-125 nmol/L in normal adults aged 20-60 years). Higher vitamin D status was defined as the upper quartile of serum 25OHD concentration (i.e., serum 25OHD \geq 49 nmol/L) versus the others combined.

The serum concentration of parathyroid hormone (PTH) was measured by immunochemoluminometric assay (DiaSorin Inc., Stillwater, MN; normal range for adults, 13-54 pg/mL). The intra- and interassay precisions were 2.0-3.6% and 3.4-4.9% respectively. All measurements were performed at the University Hospital of Angers, France.

Covariables

Demographical and clinical measures (i.e., age, gender, body mass index (BMI), number of chronic diseases, and score on the short version of the Mini-Mental State Examination (SMMSE)), functional and environmental measures (i.e., instrumental activities of daily living (IADL) score, sun exposure at midday, season of evaluation), and serum measures (PTH concentration) were recorded as potential cofounders.

All study participants included received a full medical examination by a physician, which consisted of a clinical examination, standardised questionnaires, and anthropometric measurements (i.e., height and weight to calculate the BMI= height/weight², in kg/m²). The number of comorbidities, i.e. diseases of indefinite duration or running a course with minimal change, was also sought by questioning the patients, relatives and general practitioners. Cognitive performance was assessed using the S- MMSE score, a reliable, reproducible and validated test for the diagnosis of dementia with a score ranging between 0-6 (best) (Haubois G et al 2011). Functionality was evaluated with the 4-item IADL score, ranging from 0 to 4 (worst) (Pérès K et al, 2006). Sun exposure during the 3 past months was assessed using the following standardized question “When the weather is nice, do you stay outside more than 15 minutes exposed to the sun (face and hands uncovered) between 11am and 3pm?” (Annweiler

C et al, 2012). Finally, the season of evaluation was recorded as follows: spring from March 21 to June 20, summer from June 21 to September 20, fall from September 21 to December 20, winter from December 21 to March 20.

Statistical analyses

The participants' characteristics were summarized using means and standard deviations (SD) or frequencies and percentages, as appropriate. Normality of data distribution was checked using skewness-kurtosis test. As the number of observations was higher than 40, comparisons were not affected by the shape of the error distribution and no transform was applied (Rochon et al, 2012). Firstly, comparisons between participants separated into two groups based on the diagnosis of BP were performed using Student's t-test or the Chi-square test, as appropriate. Secondly, univariate and multiple linear regressions were used to examine the association between high vitamin D status (i.e., 25OHD \geq 49nmol/L; independent variable) and the diagnosis of BP (dependent variable), while adjusting for potential confounders. Finally, Pearson correlations were used to examine among BP cases the relationship between serum 25OHD concentration and the severity of BP (i.e., bullae grade, and lesions extent grade). P-values <0.05 were considered significant. All statistics were performed using SPSS (v19.0, IBM Corporation, Chicago, IL).

Standard Protocol Approvals, Registrations and Patients Consents

All participants in the study were included after having given their consent. The study was conducted in accordance with ethical standards set forth in the Helsinki Declaration (1983). The project was approved by the local ethics committee (N°1635125v0).

RESULTS

Thirty cases of BP (21 women and 9 men) and 60 controls were recruited. Seven other patients with a *de novo* diagnosis of BP could not be included in our study because they were

younger than 70 years (n=5) or because they were regularly taking vitamin D supplements (n=3). The mean age of included participants was 83.0 ± 6.6 years (Table 1), and the mean 25OHD concentration was 33.0 ± 18.8 nmol/L. There were no significant difference between the mean 25OHD concentration in BP patients (29.6 ± 17.1) compared to controls without PB (34.8 ± 19.6) ($p = 0.211$).

There were no other differences between cases and matched controls.

Table 2 shows post-hoc analysis with univariate and multiple logistic regressions between higher vitamin D status and the diagnosis of BP. Higher vitamin D, defined as the upper quartile of serum 25OHD concentration (i.e., $25\text{OHD} \geq 49$ nmol/L), was associated with fewer BP (fully adjusted OR=0.26, P=0.044). Among BP cases, 25OHD concentration correlated inversely with the severity of the disease ($r = -0.41$ with $P = 0.023$ for bullae grade; $r = -0.47$ with $P = 0.008$ for lesions extent grade).

Regarding PB severity, 16 cases had ≤ 5 bullae at diagnosis, 8 had 6-20 bullae, 3 had 20-50 bullae, and 3 had > 50 bullae. Five BP cases (16%) had a significant lesions extent on 5 cutaneous territories. As illustrated in Figure 1, serum 25OHD concentration correlated inversely with the severity of PB ($r = -0.41$ with $P = 0.023$ for bullae grade; $r = -0.47$ with $P = 0.008$ for lesions extent grade).

DISCUSSION

There was no significant difference between the mean 25OHD concentrations in BP patients compared to controls without PB. However, the main finding of the present study is that controls without BP exhibited more often higher vitamin D status than BP cases. The association remained significant even after adjustment for all measured potential confounders. Moreover, higher 25OHD concentrations correlated with lower severity of the disease (bullae grade, and lesions extent grade) among BP cases.

There is growing epidemiological evidence on a beneficial effect of higher vitamin D status on the onset and progression of autoimmune disorders (Baeke F et al, 2010, Munger KL et al. 2006; Ben-Zvi I, et al. 2010). Only two studies (Marzano et al, 2012; Turkaj et al., 2012) focused specifically on the association between serum 25OHD concentration and BP. Marzano et al. showed that 15 BP cases aged 66.9 years on average (range, 48-96 years) had lower serum 25OHD concentrations than 15 controls matched for age, gender and BMI (Marzano et al., 2012). Nevertheless, various limitations precluded any conclusion regarding the involvement of hypovitaminosis D in BP history. In particular, important confounders such as comorbidities, cognition, autonomy status and serum PTH, were not taken into account. It has been yet proposed that the non-bone effects of hypovitaminosis D may be explained not directly by effects of vitamin D, but rather indirectly by concomitant increase in serum PTH (Annweiler C et al., 2010). It appears therefore appropriate to consider these two molecules concurrently when examining the association of vitamin D with health issues. The second study by Turkaj et al reported divergent results, namely no difference in serum 25OHD concentration between 12 PB cases and 32 age- and sex-matched controls (Turkaj et al, 2012). Apart from its rather small sample size, the latter study was also limited by the failure to take into account a number of confounding factors. In contrast, our study included a larger number of participants and analyses were adjusted for numerous covariables, making our results more robust.

We found that higher vitamin D status was inversely associated with the diagnosis of BP. Exactly how lower vitamin D levels and BP are associated and if the association is causal remains not fully elucidated. A first explanation may be that older individuals with BP are more likely to have impaired cognitive and functional abilities (Bastuji-Garin S et al, 2007; Foureur N et al, 2006; Leung CL et al, 2001), leading subsequently to lower vitamin D

intakes and less often higher vitamin D status. However, our study focused on previously untreated patients with BP, which means that the disease was not advanced and was unlikely to precipitate loss of independence. Our results consistently showed that there was no between-group difference regarding sun exposure, nutrition status (BMI), functionality (IADL) and cognition (S-MMSE). This explanation is thus unlikely here. Alternatively, it can be proposed that higher vitamin D status lowers the risk of PB.

Evidence precisely supports a role for vitamin D in autoimmune disorders. So, we suggest that vitamin D might play a role on the pathophysiology of BP. On one hand, animal experiments have shown that vitamin D plays a role in the maintenance of immune homeostasis (Baeke F et al, 2010). In the skin, myeloid dendritic cells (M-DC) are key targets of calcitriol and through this action, vitamin D induced from naive T-cells to differentiate Foxp3-expressing regulatory T-cells and suppressed the differentiation of lymphocytes T-helper-1 (Th1) and Th17. (Schoindre Y et al., 2012).

On the other hand, the pathogenesis of BP involves the same mechanisms. In particular, Th17 cells and the cytokines they release, in particular the Interleukine 17 (IL-17), may play a role in pathogenesis of BP, accounting for characteristic features of this disease, such as neutrophil infiltration and eosinophil recruitment, which cannot be simply explained by the presence of autoantibodies toward structural components of the hemidesmosome (BP180 and BP230). This IL is important in initiation and maintenance of many autoimmune reactions, and it is involved in production of pro-inflammatory cytokines, matrix metalloproteinases and recruitment of neutrophils and eosinophils, all of which are important pathogenic factors in BP (Ada Lo Schiavo et al, 2013). A very recent study (Arakawa M et al, 2011) shows that BP had more Th17 cell-related inflammation and less Treg-related regulation.

Thus, it turns out that vitamin D may have an effect on some immune pathways into play in

the pathophysiology of BP.

The strengths of our study include the standardized collection of data from a single research center, the detailed description of the participants' characteristics, and the use of regression models to measure adjusted associations. Regardless, a number of limitations also existed. Firstly, the case-control design limits the exploration of the association of vitamin D with BP and limits conclusions regarding causality compared to prospective longitudinal cohort studies. Secondly, the study cohort was restricted to 30 older inpatients that might be unrepresentative of all seniors, even if this sample size was the largest one examined thus far on this specific issue. What is more, BP diagnosis and treatment are usually initiated at the hospital, which reinforces the representativeness of our study. In addition, enrolling patients in a single center made it possible to centralize vitamin D assays in a single laboratory and to avoid inter-laboratory variability.

Conclusion

We found that higher vitamin D level was inversely associated with the diagnosis and the severity of BP. These results suggest that vitamin D is involved in the natural history of BP, but also that enhancing vitamin D status in older adults may represent an efficient strategy to prevent the severity of PB. Future prospective studies are needed to confirm this hypothesis and to clarify the effects of vitamin D on BP.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the participants for their cooperation.

CONFLICT OF INTEREST

- **Disclosures:**

- The authors report no conflict of interest with this manuscript. They have no relevant financial interest in this manuscript.

- **Funding:**

- The study was financially supported by SVR
- The sponsor had no role in the design and conduct of the study, in the collection, management, analysis, and interpretation of the data, or in the preparation, review, or approval of the manuscript.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

- MES has full access to the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analyses.
- Study concept and design: MES, LM, OB and CA.
- Acquisition of data: MES and LM.
- Analysis and interpretation of data: MES and CA.
- Drafting of the manuscript: MES and CA.
- Critical revision of the manuscript for important intellectual content: LM, EL and OB.
- Obtained funding: MES.
- Statistical expertise: CA.
- Administrative, technical, or material support: LM.

- Study supervision: CA.

REFERENCES

- Annweiler C, Allali G, Allain P, et al. Vitamin D and cognitive performance in adults: a systematic review. *Eur J Neurol*. 2009; 16: 1083-1089.
- Annweiler C, Schott AM, Berrut G, et al. Vitamin D and ageing: neurological issues. *Neuropsychobiology*. 2010; 62: 139-150.
- Annweiler C, Le Gall D, Fantino B, et al. 25 hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology*. 2010; 6: 75-95.
- Annweiler C, Schott AM, Beauchet O. Proposal and validation of a quick question to rate the influence of sun exposure in geriatric epidemiological studies on vitamin D. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012; 82: 412-416.
- Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, et al. Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol*. 2011; 20: 1022-1024.
- Baeke F, Takiishi T, Korf H, et al. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010; 10: 482-496.
- Bastuji-Garin S, Lemordant P, Bonnetblanc JM, et al. Etude épidémiologique prospective des facteurs de risque de la pemphigoïde. *Ann Dermatol Venereol* 2007; 134:S7.
- Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2010; 5:e9193.
- Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function. *Vitam Horm* 2011; 86: 1-21.
- Bouvard B, Annweiler C, Sallé A, et al. Extraskeletal effects of vitamin D: facts, uncertainties, and controversies. *Joint Bone Spine* 2011; 78: 10-16.
- Chaidemenos GC, Maltezos E, Chrysomallis F, et al. Value of routine diagnostic criteria of bullous pemphigoid. *Int J Dermatol* 1998; 37: 206-210.
- Courville P, Kupfer I, Gilbert D, et al. Evaluation of histological criteria for bullous pemphigoid. Correlations with antigens recognized by immunoblotting of anti-epidermal

autoantibodies. *Ann Pathol* 2000; 20: 546-569.

- Foureur N, Mignot S, Senet P, et al. Corrélation entre la présence d'anticorps antiantigène de type 2 de la pemphigoïde bulleuse et démence chez les sujets âgés sans manifestation clinique de pemphigoïde bulleuse. *Ann Dermatol Venereol* 2006; 133: 439-443.
- Haubois G, Annweiler C, Launay C, Fantino B, de Decker L, Allali G, Beauchet O. Development of a short form of Mini-Mental State Examination for the screening of dementia in older adults with a memory complaint: a case control study. *BMC Geriatr.* 2011; 11: 59.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.
- Joly P. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *BMJ* 2008; 337: 209.
- Joly P, Roujeau JC, Benichou J, et al. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with BP: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1681-1687.
- Jung M, Kippes W, Messer G et al. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 266-268.
- Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; 9: 337.
- Leung CL, Zheng M, Prater SM, et al. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 2001; 154: 691-697.
- Marzano A.V., Trevisan V., Eller-Vainicher C et al. Evidence for vitamin D deficiency and increased fractures' prevalence in autoimmune bullous skin diseases. *BJD* 2012; 167: 688-691.

- Munger KL, Levin LI, Hollis BW et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006; 296: 2832-2838.
- Pérès K, Chrysostome V, Fabrigoule C, Orgogozo JM, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Restriction in complex activities of daily living in MCI: impact on outcome. *Neurology* 2006; 67: 461-466.
- Person JR, Rogers RS. Bullous and cicatricial pemphigoid. Clinical, histopathologic, and immunopathologic correlations. *Mayo Clin Proc* 1977; 52: 54-66.
- Rochon, J., Gondan, M., Kieser, M. To test or not to test: Preliminary assessment of normality when comparing two independent samples. *BMC Med Res Methodol* 2012; 12, 81.
- Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, et al. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1998; 134: 465-469.
- Shiavo AL, Ruocco E, Brancaccio G, et al. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factor : facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2013; 31: 391-399.
- Schoindre Y, Terrier B, Kahn JE, et al. Vitamin D and autoimmunity. First part: Fundamental aspects. *Rev Med Interne*. 2012; 33: 80-86.
- Tukaj S, Schmidt E, Recke A, et al. Vitamin D status in bullous pemphigoid patients. *BJD* 2013; 168: 873-874.
- Vaillant L, Bernard P, Joly P, et al. Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1075-1080.

Table 1. Characteristics and comparison* of cases with bullous pemphigoid (n=60) and matched controls without bullous pemphigoid (n=30)

	Total sample (n=90)	Bullous pemphigoid		P-Value*
		Yes (n=30)	No (n=60)	
Demographical and clinical measures				
Age, years	83.0±6.6	83.0±6.8	83.0±6.6	0.973
Female gender, n (%)	60 (66.7)	21 (67.7)	39 (66.1)	0.875
Body mass index, kg/m ²	26.6±6.4	25.5±4.9	27.2±7.0	0.215
Number of chronic diseases	5.1±2.5	5.2±2.3	5.1±2.6	0.797
S-MMSE score, /6	3.8±1.9	3.5±2.1	3.9±1.8	0.259
Functional and environmental measures				
IADL score, /4	1.9±1.5	1.7±1.6	2.0±1.5	0.297
Sun exposure at midday, n (%)	36 (40.0)	11 (35.5)	25 (42.4)	0.526
Season of evaluation				0.992
Spring, n (%)	12 (13.3)	4 (12.9)	8 (13.6)	-
Summer, n (%)	24 (26.7)	8 (25.8)	16 (27.1)	-
Fall, n (%)	24 (26.7)	8 (25.8)	16 (27.1)	-
Winter, n (%)	30 (33.3)	11 (35.5)	19 (32.2)	-
Serum measures				
Vitamin D				
25-hydroxyvitamin D concentration, nmol/L	33.0±18.8	29.6±17.1	34.8±19.6	0.211
Parathyroid hormone concentration, pg/mL	43.2±49.3	36.4±24.4	46.5±57.7	0.378

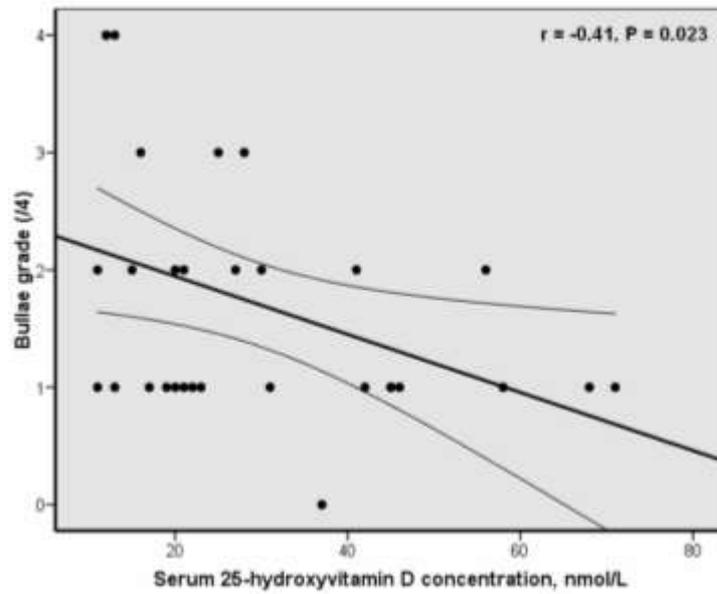
Data presented as mean±standard deviation where applicable. IADL: Instrumental Activities of Daily Living; S-MMSE: Short version of Mini-Mental State Examination; *: Comparisons between participants with and without bullous pemphigoid based on *t*-test or Chi-square, as appropriate;

Table 2. Univariate and multiple logistic regression models examining the cross-sectional association between higher vitamin D level* and bullous pemphigoid, adjusted for potential confounders

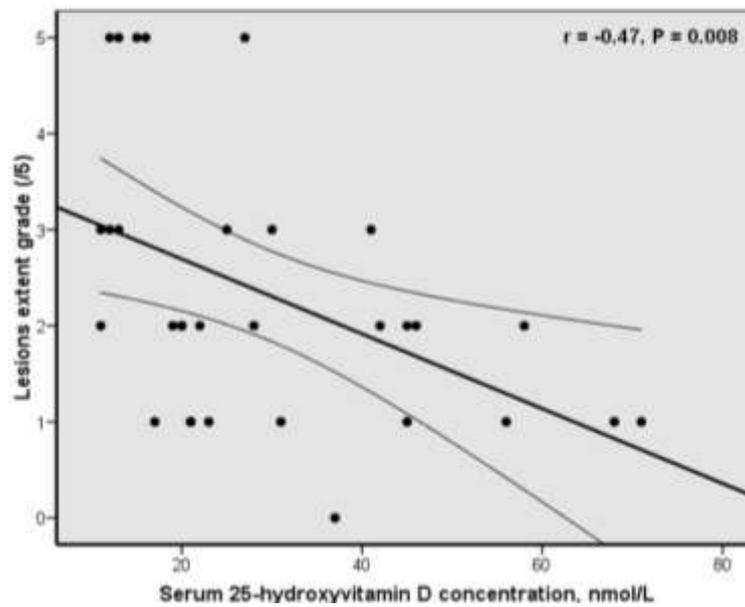
	Bullous pemphigoid							
	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
	Unadjusted OR [95%CI]	P- Value	Adjusted OR [95%CI]	P- Value	Adjusted OR [95%CI]	P- Value	Fully adjusted OR [95%CI]	P- Value
Higher vitamin D level*	0.30	0.049	0.25	0.029	0.25	0.030	0.26	0.044
	[0.09;0.99]		[0.07;0.86]		[0.07;0.87]		[0.07;0.96]	
Age	1.00	0.972	0.96	0.302	0.95	0.257	0.95	0.248
	[0.94;1.07]		[0.89;1.04]		[0.88;1.04]		[0.87;1.04]	
Female gender	1.08	0.875	1.21	0.704	1.20	0.737	1.49	0.487
	[0.43;2.72]		[0.45;3.29]		[0.42;3.44]		[0.48;4.59]	
Body mass index	0.95	0.216	0.94	0.146	0.94	0.150	0.96	0.333
	[0.88;1.03]		[0.86;1.02]		[0.86;1.02]		[0.88;1.05]	
Number of chronic diseases	1.02	0.794	1.12	0.299	1.11	0.325	1.14	0.244
	[0.86;1.22]		[0.91;1.38]		[0.90;1.38]		[0.91;1.42]	
S-MMSE score	0.88	0.257	0.85	0.191	0.89	0.516	0.90	0.556
	[0.70;1.10]		[0.66;1.09]		[0.63;1.27]		[0.62;1.29]	
IADL score	0.86	0.294	-		0.89	0.645	0.86	0.572
	[0.64;1.14]				[0.53;1.49]		[0.51;1.45]	

Sun exposure at midday	0.75	0.527	-	1.11	0.859	1.39	0.599
	[0.30;1.84]			[0.34;3.66]		[0.41;4.72]	
Season of evaluation	1.06	0.799	-	1.09	0.718	0.97	0.909
	[0.70;1.60]			[0.69;1.72]		[0.60;1.57]	
Serum parathyroid hormone	1.00	0.387	-	-		0.99	0.304
	[0.98;1.01]					[0.98;1.01]	

Model 1: unadjusted regression; Model 2: adjusted for demographical and clinical measures (age, gender, body mass index, number of chronic diseases, and S-MMSE score); Model 3: Model 2 + adjustment for functional and environmental measures (IADL score, sun exposure and season of evaluation); Model 4: Model 3 + adjustment for serum measures (parathyroid hormone concentration); CI: confidence interval; IADL: Instrumental Activities of Daily Living; S-MMSE: Short Mini-Mental State Examination; OR: odds ratio; *: serum 25-hydroxyvitamin D \geq 49 nmol/L; OR significant indicate. d in bold.



(A)



(B)

Figure 1. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and severity of bullous pemphigoid among 30 cases: (A) bullae grade; (B) lesions extent grade. The tick line is the best-fit linear regression line, and the thin lines at the top and bottom are the limits of the 95% confidence interval.

REFERENCES

- Annweiler C, Allali G, Allain P, et al. Vitamin D and cognitive performance in adults: a systematic review. *Eur J Neurol*. 2009; 16: 1083-1089.
- Annweiler C, Schott AM, Berrut G, et al. Vitamin D and ageing: neurological issues. *Neuropsychobiology*. 2010; 62: 139-150.
- Annweiler C, Le Gall D, Fantino B, et al. 25 hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology*. 2010; 6: 75-95.
- Annweiler C, Schott AM, Beauchet O. Proposal and validation of a quick question to rate the influence of sun exposure in geriatric epidemiological studies on vitamin D. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012; 82: 412-416.
- Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, et al. Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol*. 2011; 20: 1022-1024.
- Baeke F, Takiishi T, Korf H, et al. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010; 10: 482-496.
- Bastuji-Garin S, Lemordant P, Bonnetblanc JM, et al. Etude épidémiologique prospective des facteurs de risque de la pemphigoïde. *Ann Dermatol Venereol* 2007; 134:S7.
- Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2010; 5:e9193.
- Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function. *Vitam Horm* 2011; 86: 1-21.
- Bouvard B, Annweiler C, Sallé A, et al. Extraskelétal effects of vitamin D: facts, uncertainties, and controversies. *Joint Bone Spine* 2011; 78: 10-16.
- Chaidemenos GC, Maltezos E, Chrysomallis F, et al. Value of routine diagnostic criteria of bullous pemphigoid. *Int J Dermatol* 1998; 37: 206-210.
- Courville P, Kupfer I, Gilbert D, et al. Evaluation of histological criteria for bullous

- pemphigoid. Correlations with antigens recognized by immunoblotting of anti-epidermal autoantibodies. *Ann Pathol* 2000; 20: 546-569.
- Foureur N, Mignot S, Senet P, et al. Corrélation entre la présence d'anticorps antiantigène de type 2 de la pemphigoïde bulleuse et démence chez les sujets âgés sans manifestation clinique de pemphigoïde bulleuse. *Ann Dermatol Venereol* 2006; 133: 439-443.
 - Hauboys G, Annweiler C, Launay C, Fantino B, de Decker L, Allali G, Beauchet O. Development of a short form of Mini-Mental State Examination for the screening of dementia in older adults with a memory complaint: a case control study. *BMC Geriatr*. 2011; 11: 59.
 - Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.
 - Joly P. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *BMJ* 2008; 337: 209.
 - Joly P, Roujeau JC, Benichou J, et al. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with BP: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1681-1687.
 - Jung M, Kippes W, Messer G et al. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 266-268.
 - Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; 9: 337.
 - Leung CL, Zheng M, Prater SM, et al. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 2001; 154: 691-697.
 - Marzano A.V., Trevisan V., Eller-Vainicher C et al. Evidence for vitamin D deficiency and increased fractures' prevalence in autoimmune bullous skin diseases. *BJD* 2012; 167: 688-691.

- Munger KL, Levin LI, Hollis BW et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006; 296: 2832-2838.
- Pérès K, Chrysostome V, Fabrigoule C, Orgogozo JM, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Restriction in complex activities of daily living in MCI: impact on outcome. *Neurology* 2006; 67: 461-466.
- Person JR, Rogers RS. Bullous and cicatricial pemphigoid. Clinical, histopathologic, and immunopathologic correlations. *Mayo Clin Proc* 1977; 52: 54-66.
- Rochon, J., Gondan, M., Kieser, M. To test or not to test: Preliminary assessment of normality when comparing two independent samples. *BMC Med Res Methodol* 2012; 12, 81.
- Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, et al. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1998; 134: 465-469.
- Shiavo AL, Ruocco E, Brancaccio G, et al. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factor : facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2013; 31: 391-399.
- Schoindre Y, Terrier B, Kahn JE, et al. Vitamin D and autoimmunity. First part: Fundamental aspects. *Rev Med Interne*. 2012; 33: 80-86.
- Tukaj S, Schmidt E, Recke A, et al. Vitamin D status in bullous pemphigoid patients. *BJD* 2013; 168: 873-874.
- Vaillant L, Bernard P, Joly P, et al. Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1075-1080.

