

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Science, Médecine, Santé

Faculté de Médecine

Laboratoire d'Immunologie, UMR CNRS 6101

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Science de la vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Abir AL YOUSSEF

Le 29 mai 2006

**Anticorps anti BP 180 et système HLA dans les pemphigoïdes
auto-immunes**

Directeurs de Thèse : Michel Cogné et Mireille Drouet.

Jury :

Président : Pr. Michel Cogné, UMR CNRS 6101, Limoges

Rapporteurs : Pr. Michel Abbal, CHU Purpan, Toulouse

Dr. Jean Luc Taupin, UMR CNRS 5764, Bordeaux.

Examineurs : Pr. : Christophe Bedane, Service de Dermatologie, CHU, Limoges

Dr. Pierre Yves Robert, Service d'Ophtalmologie, CHU, Limoges

Dr. Mireille Drouet, UMR CNRS 6101, CHU, Limoges

Remerciement

Ce travail s'est déroulé au Laboratoire de physiologie moléculaire de la réponse immune et des lymphoproliférations UMR CNRS 6101-Faculté de médecine de Limoges et au Laboratoire d'immunologie au CHU dirigés par Monsieur le Professeur Michel Cogné.

Je tiens plus particulièrement à exprimer mes remerciements tout d'abord à Michel Cogné qui m'a accueilli dans son équipe et pour l'honneur qu'il m'a fait de présider le jury de cette thèse.

J'adresse toute ma profonde gratitude et ma reconnaissance à Mireille Drouet pour l'accueil cordial qu'elle m'a réservé ainsi que pour l'attention avec laquelle elle a dirigé ce travail, ses conseils scientifiques m'ont été d'une grande utilité pour l'aboutissement de ce travail. Je la remercie pour m'avoir initié au monde de la recherche et pour m'avoir permis de conduire et terminer ce travail malgré ses occupations et son temps chargé.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Michel Abbal, et Dr. Jean Luc Taupin, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté de juger ce travail et apporter leurs appréciations.

Je tiens plus particulièrement à exprimer mes remerciements à Pr. Christophe Bedaine et Dr. Pierre Yves Robert, pour leurs conseils et aides scientifiques. Leurs encouragements m'ont été d'une aide précieuse. Je les remercie de l'honneur que ils me font en acceptant de participer à ce jury et d'en être l'examineurs. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse et sincère reconnaissance.

Un grand merci du fond du cœur à tous les membres de l'équipe UMR CNRS 6101 ainsi que toutes les personnes pour leur soutien et leurs encouragements. Un remerciement spécial à Cathy et Yves et Ahmed pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils et leurs aides.

Merci pour les membres du Laboratoire d'immunologie du CHU (surveillante, techniciens et secrétaire) pour leur gentillesse et leur disponibilité qui m'ont accompagnées et qui de près ou de loin ont contribué au bon déroulement de ce travail dans une ambiance amicale.

D'un point de vue plus personnel je remercie toute ma famille et mes amis. Ce travail n'aurait pu aboutir sans leur soutien, leur confiance et leur amour.

Sommaire

Liste des figures	6
Liste des tableaux	8
Abréviation:.....	9
<u>Introduction:</u>	11
I- Système HLA :	13
1-Généralités.....	13
1-1-Historique.....	14
1-2-Les gènes HLA.....	15
1-3-Les glycoprotéines HLA	16
1-3-1-Structure primaire et secondaire.....	17
1-3-2-Structure tridimensionnelle.....	19
1-3-3-Expression cellulaire des produits	19
1-3-4-Expression physiologique.....	20
1-3-5-L'assemblage.....	20
Le processing	21
2-Le polymorphisme HLA	24
3-La fonction biologique des molécules de HLA.....	28
II-HLA et maladie auto-immunes	31
Interaction peptide et poche	32
III- Les systèmes de cohésion de peau	34
1-Systèmes de cohésion au sein de l'épiderme	34
2-Systèmes de cohésion entre le derme et l'épiderme	36
IV- Dermatoses bulleuses auto- immunes.....	41
Dermatoses bulleuses auto- immunes sous-épidermiques	41
Pemphigoïde bulleuse (PB) :	42
La pemphigoïde cicatricielle (PC)	42
La pemphigoïde gravidique (herpès gestations) (PG)	44
L'épidermolyse bulleuse anquise (EBA)	44
La dermatose à IgA linéaire (DL IgA)	44

Les anticorps anti BP180 :.....	45
V-Implication du système HLA dans les dermatoses bulleuses auto-immunes.....	48
Immunogénétique et pemphigus	48
Immunogénétique et pemphigoïde.....	49
Objectifs de travail	52
Le phénotype HLA influence-t-il la réponse humorale anti BP 180 ?.....	52
Quel est l'effet des cytokines, impliquées dans l'PCO, sur l'expression des molécules HLA de classe II à la surface des cellules conjonctivales ?.....	52
<u>Matériels et Méthodes</u>	53
Matériel	53
Recherche d'anticorps anti BP 180 :.....	53
A- Recherche d'anticorps anti bp180 par l'ELISA	53
1- Choix du vecteur et principe	53
2- Préparation et contrôle des inserts.....	54
2-1- Extraction de l'ARN m	54
2-2-Production d'DNAc par Transcription inverse (RT).....	56
2-2-1-Principe de la transcription inverse	56
2-2-2-Protocole expérimental	56
2-3-Amplification d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	56
2-3-1-Principe de la PCR.....	56
2-3-2-Protocole expérimental	57
2-3-3-Contrôle du produit PCR par la Migration horizontale en gel d'agarose :.....	58
3-Ligature de l'insert dans le plasmide	58
3-1-Principe de la ligature.....	58
3-2-Protocole expérimental.....	60
3-2-1-Protocole de digestion	60

3-2-2-Séparation et isolement d'un fragment d'ADN par électrophorèse	60
3-3-Ligatures de fragments d'ADN à extrémités cohésives dans le vecteur :	61
4-Production des peptides par les bactéries	61
4-1 Souches bactériennes	61
4-2-Préparation de bactéries compétentes	61
4-3-Transformation des bactéries par un plasmide	61
4-3-1-Principe	61
4-3-2-Protocole expérimental.....	62
4-4-Mise en culture de bactéries transformées	62
4-5-Contrôle de l'insert.....	62
4-5-1-Extraction de l'ADN plasmidique.....	62
4-5-1-1-Minipréparation d'ADN.....	62
4-5-1-2-Maxipréparation.....	63
4-5-2-Séquençage de l'ADN	63
4-5-3-Analyse informatique de l'ADN.....	64
5- Expression et purification des protéines de fusion GST-PARL.....	64
5-1-Principe.....	64
5-2-Protocole expérimental.....	64
6- Contrôle des peptides :	66
6-1-Contrôle quantitatif	66
6-2-Contrôle qualitatif : La réactivité des peptides.....	66
ELISA anti BP180	66
Protocole du test ELISA	67
B - Identification d'anticorps sériques anti peau par western blot	68
Principe :	68
Western blot pour les protéines épidermiques.....	68
Préparation de l'extrait épidermique	68
Réaction immunologique.....	69

Analyse de l'expression des molécules HLA sur les cellules conjonctivales	70
Lignées cellulaires	70
Conditions de culture des lignées	70
Réalisation des Immuno-empreintes	71
Marquage direct des molécules HLA	71
Analyse en cytométrie de flux	72
Analyse immunogénétique	72
Extraction d'ADN génomique eucaryote	72
Typage HLA générique et allélique	72
Analyse statistique.....	72
Annex tampon	73
<u>Résultats</u>	75
I- Anti BP 180 et HLA.....	75
1-Validation des peptides de synthèse	76
2-Comparaisons de la détection des anticorps anti BP 180 par la technique ELISA et la technique de Western blot sur les sérums de patients	76
Détermination du seuil de positivité des tests ELISA	76
Analyse des sérums de patients.....	76
3-Distribution de la fréquence des allèles HLA dans les pemphigoïdes bulleuses dans la région Limousin	78
4-Réponses anti BP 180 et phénotype HLA.....	79
II- Expression des molécules HLA sur les cellules conjonctivales	82
1-Les lignées	82
1-1-Effet de chaque cytokine	82
1-2-Effet combiné de l'IFN γ et du TNF α	84
2-2-1-Sur l'expression cellulaire des molécules HLA-ABC.....	84
2-2-2-Sur l'expression cellulaire des molécules HLA-DR	85
2-2-3-Sur l'expression cellulaire des molécules HLA-DQ	85

1-3-Effet du TGFβ1.....	86
III-Empreintes oculaires.....	88
Expression des molécules HLA-ABC.....	88
Expression des molécules HLA-DR	89
Expression des molécules HLA-DQ	89
Discussion:	92
Conclusion :.....	97
Bibliographie:.....	98

Liste des figures

Figure N° 1 : Carte simplifiée des gènes de la région HLA.....	15
Figure N° 2 : Représentation schématique des molécules HLA de classe I et de classe II...18	18
Figure N° 3 : Schémas des structures des molécules HLA de classe I et II.....18	18
Figure N° 4 : Schéma représentatif des différentes étapes aboutissant à l'expression des molécules HLA à la membrane cellulaire.....23	23
Figure N° 5 : Carte épitopique des diverses spécificités HLA II.27	27
Figure N° 6 : Schéma représentatif de la fonction des molécules HLA de classe I et HLA de classe II.....28	28
Figure N° 7 : Représentation schématique de la tolérance centrale pendant la maturation de thymocytes.....29	29
Figure N° 8 : Schéma représentatif de la fonction des molécules HLA dans la réponse immunitaire.....30	30
Figure N° 9 : Distribution des desmosomes et des hémidesmosomes dans les cellules épithéliales.....35	35
Figure N° 10 : Structure schématique de la jonction dermo-épidermique.....37	37
Figure N° 11 : Protéines de filaments intermédiaires dans les cellules épithéliales fortement impliqués dans les jonctions d'ancrage.....38	38
Figure N° 12 : Structure de la protéine transmembranaire BP180 ou BPAg2.....47	47
Figure N° 13 : Schéma représentant le plasmide PGEX-5X-1.....55	55
Figure N° 14 : Schéma montrant la ligature de l'insert dans le plasmide.....59	59
Figure N° 15 : Etapes de la purification de la protéine de fusion.....65	65
Figure N° 16 : Technique ELISA.....66	66
Figure N° 17 : Contrôle de synthèse des peptides : SDS page des peptides NH ₂ et COOH...75	75
Figure N° 18 : Calcul du seuil de sensibilité : Densité optique moyenne obtenue par technique ELISA avec les peptides NH ₂ et COOH par analyse des sérums de 60 témoins sains.....76	76
Figure N° 19 : ELISA des peptides NH ₂ et COOH de la PB180.....77	77
Figure N° 20 : Comparaison de l'effet des cytokines de l'IFN γ et TNF α sur l'expression cellulaire des molécules HLA-ABC sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée LY-91.....83	83

Figure N° 21 : Comparaison de l'effet combiné de l'IFN γ et du TNF α sur l'expression cellulaire des molécules HLA-ABC sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée LY-91...	84
Figure N° 22 : Comparaison de l'effet combiné de l'IFN γ et du TNF α sur l'expression cellulaire des molécules HLA-DR sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée LY-91.....	85
Figure N° 23 : Modification de l'expression des molécules de classe I induite par le TGF β 1 sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 cultivée pendant 24 heures en présence d'INF γ et/ou TNF α	86
Figure N° 24 : Modification de l'expression des molécules de classe II induite par le TGF β 1 sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 cultivée pendant 24 heures en présence d'INF γ et/ou TNF α	87
Figure N° 25 : Expression des molécules HLA-ABC sur les cellules conjonctivales <i>in vivo</i> : graphe A pourcentage de cellules conjonctivales exprimant les molécules HLA-ABC ; figure B : moyenne de fluorescence des cellules HLA-ABC positives.....	88
Figure N° 26 : Expression des molécules HLA-DR sur les cellules conjonctivales <i>in vivo</i>	89
Figure N° 27 : Expression des molécules HLA-DQ sur les cellules conjonctivales <i>in vivo</i>	89
Figure N° 28 : Histogrammes montrant l'expression de surface des molécules HLA sur la lignée conjonctivale 1-5C-4.....	90
Figure N° 29 : Cytogramme en flux des cellules conjonctivales obtenu en cytométrie.....	91
Figure N°30 : Histogrammes montrant l'expression de surface des molécules HLA sur des cellules conjonctivales obtenues par empreintes conjonctivales chez 3 malades.....	91

Liste des tableaux

Tableau N° 1 : Nombre d'allèles spécifiques connus en 2005 pour chaque locus.....	24
Tableau N° 2 : Récapitulatif des études HLA et pemphigoïdes.....	51
Tableau N° 3 : Les amorces et les programmes utilisés pour les PCR.....	58
Tableau N° 4 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	71
Tableau N° 5 : Comparaison des résultats obtenus pour la recherche d'anticorps anti BP180 par technique ELISA/ Western blot.....	77
Tableau N° 6 : Distribution du nombre de patients exprimant les allèles HLA-DRB1 en fonction de la présence d'anticorps anti PB180-NH2 ou (et) COOH détectés par ELISA.....	80
Tableau N° 7 : Distribution du nombre de patients exprimant les allèles HLA DQB1 en fonction de la présence d'anticorps anti PB180-NH2 ou (et) COOH détectés par ELISA.....	81
Tableau N° 8 : Distribution du nombre de patients exprimant les allèles HLA DQA1 en fonction de la présence d'anticorps anti PB180-NH2 ou (et) COOH détectés par ELISA.....	81

Abréviations

Ac : anticorps.

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire.

Ag : Antigène.

Ag PB180 : antigène de 180 kD.

Ag PB230 : antigène de 230 kD.

APC : antigen presenting cell.

APM : antigen presenting molecule.

ARN : acide ribonucléique.

COOH : la partie carboxy terminale de Ag PB180.

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

CML : cell mediated lympholysis.

DBAI : les dermatoses bulleuses auto-immunes.

DL IgA : la dermatose à IgA linéaire.

EBA : l'épidermolyse bulleuse anquise.

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
(test avec un immunoabsorbant lié à une enzyme)

H-2 : histocompatibilité-2.

HD : hémidesmosome.

HLA : human leucocyte antigens.

HLA α : la région HLA élargie.

IEF : techniques biochimiques d'isoélectrofocalisation

Ig : immunoglobuline.

IL : interleukine

INF : interféron.

JDE : jonction dermo-épidermique.

Kb : kilobase

kD : kilodalton.

LD : Lamina densa.

LL : Lamina lucida.

NK : natural killer.

PCO : pemphigoïde cicatriciel le oculaire.

OP : oral pemphigoïde.

PB : pemphigoïde bulleuse.

PC : pemphigoïde cicatricielle.

PCR : polymérase chaîne réaction.

PCR-SSP : polymerase chain reaction sequence specific primer.

PG : La pemphigoïde gravidique (herpès gestation).

RR : risque relatif.

TCR : récepteur des cellules T.

TGF : tumor growth factor.

TM : la partie transmembranaire de Ag PB180.

TNF : tumor necrosis factor.

B2m : beta2-microglobuline.

Introduction

Les dermatoses bulleuses auto-immunes représentent un vaste groupe de maladies acquises définies par l'existence de bulles cutanées et/ou muqueuses secondaires à la fixation d'autoanticorps au niveau de protéines de structure de la jonction dermo-épidermique ou de composants transmembranaires des desmosomes entraînant des clivages et une perte de cohésion à ce niveau. La perte de l'adhésion interkératinocytaire entraîne la formation de bulles intraépidermiques et forme le groupe des pemphigus, alors que l'atteinte des protéines de la jonction dermo-épidermique provoque la constitution de bulles sous épidermiques (groupe des pemphigoïdes, epidermolyse bulleuse acquise, dermatite herpétiforme, dermatose IgA linéaire).

Nous nous sommes intéressés aux pemphigoïdes bulleuses (PB) et pemphigoïdes cicatricielles (PC), deux affections qui impliquent une réponse auto-immune contre la protéine BP180. L'épitope reconnu par les autoanticorps anti BP180 est différent pour ces 2 maladies : dans la PB, ces autoanticorps sont dirigés contre la partie transmembranaire participant à la formation des hémidesmosomes, alors que dans la PC les anticorps sont dirigés contre la partie C terminale qui participe à la formation des fibrilles d'ancrage.

Ces deux affections surviennent chez les sujets âgés. Une association avec l'allèle HLA DQB1*0301 a été montrée pour ces deux pathologies auto-immunes dans les populations caucasiennes, tant d'Amérique du Nord qu'Européenne. Cette association laisse à penser que les molécules HLA-DQ sont capables de présenter un peptide de la membrane basale aux lymphocytes T, présentation qui serait à la base de l'activation du système immunitaire. Plusieurs études tendent à montrer que les clones T autoréactifs jouent un rôle important dans ces maladies auto-immunes. Le traitement de ces pathologies fait appel à des immunosuppresseurs non spécifiques et une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans ces pathologies pourrait permettre une thérapeutique plus spécifique, telle que l'utilisation de clone T autoréactif pour contrôler la production d'auto-anticorps spécifique.

Lors de ce travail nous avons étudié l'implication des molécules HLA de classe II dans la réponse auto-immune vis-à-vis de l'antigène BP180. La première partie de ce travail présente une revue de la littérature sur le système du complexe majeur d'histocompatibilité et son association avec les maladies auto-immunes et la deuxième partie concerne les différentes dermatoses bulleuses auto-immunes objectivées et les anticorps les plus fréquemment impliqués dans leur pathogénie.

LE SYSTEME HLA

1. Généralités

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), est une série de gènes qui codent pour des molécules exprimées à la surface des cellules et impliquées dans la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T; ce nom n'indique que l'une de ses propriétés : la capacité d'induire une forte réponse immunitaire allogénique, particulièrement lors de greffes ou de transplantations. C'est cette propriété qui a été à l'origine de la découverte du CMH de la souris (Histocompatibilité 2 : H-2) et de l'homme (HLA).

Ce système a été initialement défini comme l'acteur du rejet de greffe ; il est évident que le rejet de greffe n'est pas le rôle naturel de ces gènes. Cette définition peut être reconsidérée avec les données actuelles de la génétique et de l'immunologie.

Le système HLA est formé d'une série de gènes étroitement liés qui codent des glycoprotéines. Les produits de ces gènes peuvent être définis comme l'ensemble des molécules impliquées dans la présentation de peptides au récepteur des cellules T (TCR). La définition génétique doit être complétée par la définition fonctionnelle du CMH, comme la région chromosomique où se trouvent les gènes contrôlant directement la structure et l'expression des molécules présentatrices de l'antigène (APM). Les deux définitions se complètent, mais doivent être nuancées. Cette définition concerne les molécules directement présentatrices de l'antigène (APM), mais aussi d'autres molécules pouvant contribuer à la fonction de présentation.

Les gènes et les produits du HLA sont répartis en trois classes, I, II et III (Klein, 1977), selon leurs propriétés biochimiques, leurs expressions phénotypiques et leurs fonctions.

Les produits de classe I (HLAI) sont des glycoprotéines composées d'une chaîne lourde (α ou H) associée à la β -2microglobuline (β 2m), et exprimées à la membrane de la presque totalité des cellules nucléées de l'organisme. Ils présentent un peptide endo-cellulaire aux lymphocytes T CD8+CD4-. Certains produits apparentés sont qualifiés classe I-like.

Les produits de classe II (HLA de classe II) sont des glycoprotéines composées de deux chaînes alpha et bêta, de distribution plus restreinte exprimées à la membrane des lymphocytes B, des monocytes, macrophages et des lymphocytes T activés. Ils présentent un peptide, provenant d'une protéine extracellulaire endocytosée, aux lymphocytes T CD4+CD8-

1-1 Historique :

C'est en 1936 que Peter Gorer découvrait le premier antigène du CMH chez la souris par agglutination des globules rouges, puis il démontrait à l'aide de greffes de tumeurs que cet antigène jouait un rôle important dans les phénomènes de compatibilité (ou histocompatibilité). Par la suite, il a été rendu compte que les deux systèmes, H2 et HLA, sont contrôlés par des gènes reliés avec les fonctions importantes dans le contrôle de réponse immunitaire.

En 1952, Dausset mettait en évidence le premier antigène d'histocompatibilité chez l'homme par leucoagglutination : le sérum d'un malade polytransfusé entraînait une agglutination des leucocytes de certains sujets, mais pas du donneur. Ce premier antigène HLA fut appelé Mac (du nom du malade). En 1958, Van Rood rapportait l'extrême fréquence des anticorps antileucocytaires dans le sérum de femmes multipares. L'implication de ce système dans les greffes de rein est démontrée par Kissmeyer-Nielsen en 1966 : un rejet aigu du greffon survient chez les receveurs qui ont développé des anticorps dirigés contre les antigènes receveurs.

La complexité de ce système allait conduire à la mise en place dès 1964 de plusieurs centres scientifiques pour étudier les gènes et les produits du système CMH.

Le CMH est qualifié de complexe, parce qu'il est composé d'un ensemble de gènes fonctionnant de manière coordonnée. Il existe d'autres antigènes d'histocompatibilité en dehors du CMH. En effet même lorsqu'une identité des CMH est réalisée entre donneur et receveur de greffe, celle-ci est rejetée (Counce *et al*, 1956). Les autres loci sont qualifiés de mineurs (Hmin), car le rejet de greffe est généralement moins rapide qu'en cas d'incompatibilité pour le CMH, et l'on ne détecte pas d'anticorps reconnaissant les antigènes Hmin. Le qualificatif majeur du CMH est donc justifié par l'intensité de la réponse allogénique de greffe et par la présence d'anticorps reconnaissant les produits du CMH.

1.2 Les gènes HLA

Le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme est une région du génome localisée sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) qui comporte de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune. Cette région se caractérise par une forte densité de gènes, dont la caractéristique est le déséquilibre de liaison, les allèles de loci voisins étant transmis en haplotype.

Classiquement la région HLA s'étend sur 3,6Mb. Récemment, la région HLA a été étendue à 7,6 Mb car les séquences environnantes, en particulier celles situées en partie télomérique, ont montré des gènes semblables aux gènes HLA. De plus ces gènes montrent un déséquilibre de liaison avec les gènes de la région HLA. Cette région étendue présente un intérêt dans les recherches d'association HLA et maladie (Horton *et al.*, 2004).

Elle se subdivise en 3 régions : Classe I, II et III sur la base de leurs caractéristiques structurales, leurs propriétés biochimiques, leur expression phénotypique et de leurs caractéristiques fonctionnelles.

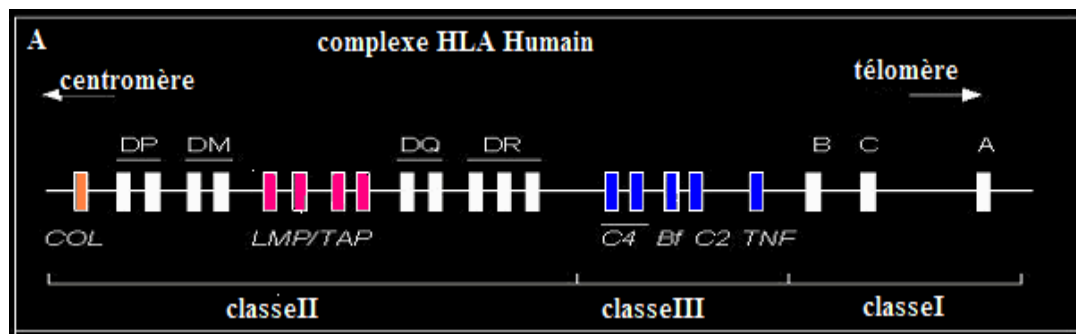


Figure N° 1 : Carte simplifiée des gènes de la région HLA. HLA (<http://www-dsv.cea.fr/thema/hla2>).

-les gènes de classe I et les gènes de classe I-like : La partie la plus télomérique mesure environ 1600 Kb. Ces dernières années, un grand nombre de gènes a été identifié dans la région de classe I. La cartographie actuelle comporte 36 gènes et comprend :

- les loci HLA-A, B et C dits classiques,
- les gènes de classe Ib ou gènes de classes I non classiques citons : E, F, G, H, J et 7.5 p/9p
- de nombreux pseudogènes.

La structure des gènes de HLA classe I, organisés en introns et en exons, a pu être déterminée à partir du premier gène HLA séquencé. Les gènes HLA-A, B et C sont constitués de 8 exons séparés par 7 introns. L'exon 1 code la séquence signal, les exons 2, 3 et 4 codent respectivement les domaines extracellulaires de la molécule HLA, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. L'exon 5 code la partie transmembranaire de la molécule, et les exons 6, 7 et 8 la partie intracytoplasmique.

Les gènes de classe II, centromériques, forment une famille homogène plus restreinte (une quinzaine chez l'homme). Les gènes de classe II codent les chaînes α et β des molécules HLA de classe II, les molécules TAP1 et TAP2, protéine transporteuse de peptides et des éléments du protéasome (gène LMP2 et LMP7). Ces gènes sont situés en position centromérique du chromosome 6. Ils comprennent principalement trois familles de gènes : DR, DP, DQ.

La région de classe II contient 23 à 25 gènes ou pseudo-gènes. Les gènes DRA, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 sont fonctionnels et produisent, selon les haplotypes, les 4 ou 3 molécules de classe II (figure 1).

Les autres gènes de classe II sont soit des pseudogènes (DRB2, DPA2, DPB2, DQB3) soit des gènes sans défaut apparent mais non transcrits (DQA2, DQB2). Les gènes DOB et DNA sont transcrits à un niveau faible dans les lymphocytes B.

Les gènes de classe III : Outre les gènes de classe I et II, le CMH compte de nombreux gènes codant des produits aussi divers que les « facteurs de nécrose des tumeurs » $TNF\alpha$ et $TNF\beta$, les composants du complément C4, C2 et Bf, les transporteurs de peptides TAP1 et TAP2, des protéines de choc thermique HSP70, une vany1-tRNA synthétase, des cytochromes P450. Malgré leur grande diversité, ces gènes sont pour la plupart impliqués dans des phénomènes immunitaires.

1.3 - Les glycoprotéines HLA :

Les molécules HLA de classe I et II sont des glycoprotéines qui appartiennent toutes les deux à la superfamille des immunoglobulines. Les molécules de classe I et II sont constituées de deux chaînes qui forment à leur surface une fente capable de contenir un peptide. Néanmoins, les molécules HLA de classe I et II diffèrent par leur taille, leur composition et leur fonction.

1-3-1-Structure primaire et secondaire :

Les molécules HLA de classe I, exprimées à la surface des cellules, sont de 55-60 kDa, composées d'une chaîne lourde transmembranaire (44 kDa) associée de façon non covalente à une chaîne légère (11.5 kDa) non glycosylée (Gerey *et al.*, 1973), la β_2 -microglobuline (β_2m) qui n'est pas implantée dans la membrane cellulaire.

La partie extra-membranaire de la chaîne lourde comporte trois domaines : deux domaines α_1 et α_2 qui s'associent pour former un sillon reposant sur un feuillet β supportant deux hélices α , et un domaine α_3 associé à la β_2m . Cette structure est le site de présentation du peptide. L'ensemble de la molécule s'inscrit dans un cylindre de 7 nm de long et 4 à 5 nm de diamètre.

La chaîne lourde H ou α est composée de 348 acides aminés :

- 274 acides aminés pour la partie extracellulaire
- 27 acides aminés pour la région transmembranaire qui est riche en acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage solide de la molécule dans la membrane.
- 28 acides aminés pour la région intracellulaire. Cette région possède des sites de phosphorylation et constitue l'extrémité carboxyterminale de la molécule.

La β_2 microglobuline est un polypeptide de 99 acides aminés ; son rôle est de maintenir la structure de la chaîne alpha par des liaisons chimiques faibles et sans doute d'en permettre l'expression extracellulaire.

Les molécules de HLA de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires de 55-60 kDa, composées de deux chaînes associées de façon non-covalente: une chaîne lourde α (31-34 kDa) est plus glycosylée que la chaîne légère β (26-29 kDa). La chaîne β est composée d'un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine C-terminal intra-cytoplasmique. Enfin, la molécule DR est glycosylée sur les asparagines α_78 (glycosylation riche en mannose), α_{117} et β_{19} (glycosylations complexes avec notamment du mannose, du fucose, de l'acide sialique et de l'acétylglucosamine).

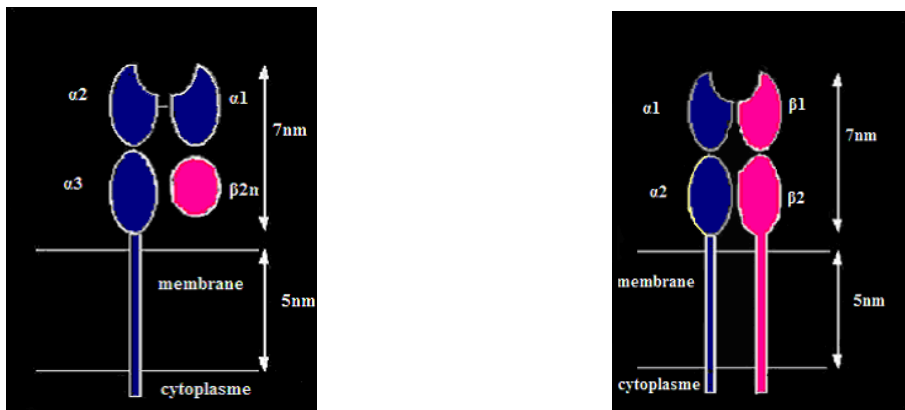


Figure N° 2 : Représentation schématique des molécules HLA de classe I et de classe II

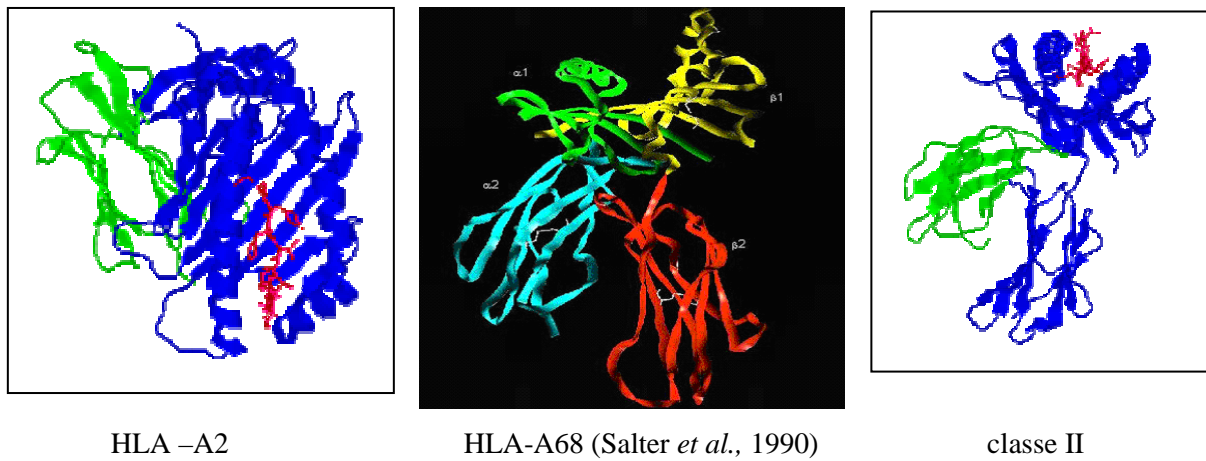


Figure N° 3 : Schémas des structures des molécules HLA de classe I et II
 (<http://www-dsv.cea.fr/thema/hla2>)

1-3-2-Structure tridimensionnelle :

La structure tridimensionnelle a été étudiée par cristallographie et a été établie par Bjorkman en 1985 sur une molécule HLA de classe II A2 (Bjorkman *et al.*, 1985).

La première structure tridimensionnelle d'une molécule de CMH II résolue est celle de HLA-DR1 (DRA*0101/DRB1*0101) complexé avec le peptide HA 306-318 issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe (Brown *et al.*, 1993 ; Stern *et al.*, 1994). Depuis, les structures tridimensionnelles de plusieurs autres molécules de CMH II ont été résolues : trois molécules humaines DRB1*0301 (Ghosh *et al.* 1995), DRB1*0401 (Dessen *et al.* 1997) et DRB1*1501 (Smith *et al.* 1998b).

Toutes les molécules de HLA de classe II présentent une structure globale identique. Chaque domaine $\alpha 2$ et $\beta 2$ se replie en deux feuillets β antiparallèles plissés à quatre et trois brins qui sont associés en une structure en sandwich β par un pont disulfure ($\alpha 2$: C107-C163, $\beta 2$: C117-C173). Ces deux domaines interagissent par leurs feuillets β .

Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$, structurellement très proches et symétriques, se replient en un feuillet β antiparallèle plissé à quatre brins, surmonté d'une longue région en hélice α d'une trentaine de résidus. Les feuillets β de ces deux domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ s'associent par liaisons hydrogène pour former un unique feuillet β à huit brins, surmonté par les deux domaines hélicoïdaux. Cette dimérisation crée un profond sillon entre les hélices α des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$. Ce sillon est le site fonctionnel de la molécule HLA de classe II où se fait la liaison des peptides.

Les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ sont des glycoprotéines transmembranaires comportant 3 parties : extracellulaire, transmembranaire et intracytoplasmique. Chaque chaîne comporte deux domaines extracellulaires. Les zones polymorphes sont localisées dans les domaines N - terminaux. La structure tridimensionnelle des molécules de classe I est comparable à celle de la molécule de classe II ; elle fait apparaître une cavité entre les domaines α_1 et α_2 dont le fond est un feuillet β plissé et les bords des hélices α . Cette cavité située au sommet de la molécule a été identifiée comme un site de liaison des peptides endogènes.

1-3-3-Expression cellulaire des produits :

Les molécules HLA s'expriment de façon **codominant**. Alors que les molécules HLA de classe I s'expriment de façon ubiquitaire, les molécules HLA de classe II s'expriment sur un nombre restreint de cellules. De plus l'expression peut être modifiée par les sécrétions de cytokines et dans diverses situations pathologiques.

1-3-4-Expression physiologique :

Les molécules de classe I sont exprimées sur la plupart des cellules de l'organisme, particulièrement sur les lymphocytes et les macrophages. Leur densité est plus faible sur les hépatocytes et très faible ou nulle sur les érythrocytes, les cellules du système nerveux central, les épithéliums acinaires du pancréas et des glandes salivaires, le trophoblaste et les cellules embryonnaires au début du développement. L'expression au niveau des hépatocytes est diversement appréciée. Si les molécules HLA-A et HLA -B sont exprimées de façon similaire à la surface des cellules, les produits HLA-C sont moins représentés (environ 10 fois moins). Les cellules humaines homozygotes pour chaque locus HLA II expriment trois ou quatre molécules HLA de classe II suivant leur haplotype DR : une ou deux molécules DR, une molécule DQ et une molécule DP.

L'expression des molécules de classe II est restreinte aux cellules présentatrices de l'antigène (APC) comme les lymphocytes B et les cellules professionnelles présentatrices telles que les macrophages, les cellules dendritiques interstitielles, les cellules de Langerhans de la peau (Colombani, 1993). Elles sont aussi exprimées à la surface des mastocytes (Frandsen *et al.*, 1993). Elles sont également présentes à la surface des lymphocytes T activés et des précurseurs érythrocytaires, granulocytaires et monocytaires. Pour les lymphocytes B et T, l'expression du HLA de classe II dépend respectivement de leur état de différenciation et de leur état d'activation. En effet, seules les cellules B matures expriment les molécules de HLA de classe II à la différence des cellules immatures et des plasmocytes, alors que les lymphocytes T doivent être activés pour exprimer ces molécules à leur surface.

Dans le thymus, les molécules HLA de classe II sont exprimées sur les cellules épithéliales du cortex et de la médulla ainsi que sur les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique. Enfin, certains tissus non lymphoïdes, comme les endothéliums capillaires, de nombreux épithéliums (langue, duodénum, épидидyme, sein, trachée...), les glomérules rénaux et la dure-mère, expriment également les produits de classe II. Il semblerait que cette expression soit constitutive. Néanmoins, cette expression peut être induite sur toutes les cellules de l'organisme par différentes cytokines (IFN, TNF,.....)

1-3-5-L'assemblage

L'expression des molécules HLA de classe I et II fait intervenir l'assemblage. L'assemblage de la β -2 microglobuline et de la chaîne lourde est nécessaire à l'expression d'une molécule fonctionnelle à la surface des cellules.

Les molécules HLA de classe I sont mobiles dans la membrane cellulaire et elles peuvent être endocytées et recyclées à la surface de la cellule.

Le processing : Ces molécules suivent la voie classique de biosynthèse des protéines membranaires. Synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE), elles traversent ensuite l'appareil de Golgi puis elles sont dirigées vers la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion constitutives (Figure N° 4).

Les protéines antigéniques sont dégradées en peptides dans le cytoplasme des cellules présentatrices de l'antigène (APC). Les peptides sont transportés du cytoplasme dans le réticulum endoplasmique (RE) par des molécules produits des gènes RING 4 ou TAP 1 (Trowsdale *et al.* 1990) et RING 11 ou TAP2 (Powis *et al.*, 1992). La dégradation du peptide se poursuit dans la lumière du RE pour aboutir à des séquences peptidiques de 8 à 9 acides aminés.

Les peptides obtenus par dégradation des protéines cytoplasmiques sont transportés dans le RE par le transporteur TAP (*transporter associated with antigen processing*) dont les deux chaînes (TAP1 et TAP2) sont codées dans le locus HLA II. Ce transporteur est localisé sur les membranes du RE et du cis-Golgi. Il réalise le transport actif du cytoplasme vers le RE de courts peptides qui se lieront aux molécules de classe I (Neefjes *et al.*, 1993). Les chaînes lourdes H et la β -2 microglobuline nouvellement synthétisées sont simultanément déposées dans le RE avec la participation de molécules accessoires (protéines p88). Peptide, chaîne H et β -2 microglobuline s'associent pour former un hétérotrimère stable qui est transporté dans l'appareil de Golgi puis à la surface de la cellule (Degen *et al.*, 1992).

Les molécules de HLA de classe II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles s'associent en proportion stoechiométrique avec des trimères de la chaîne invariante (Ii) (un dimère $\alpha\beta$ pour une molécule Ii), formant ainsi des nonamères qui sont exportés vers l'appareil de Golgi (Cresswell *et al.*, 1992 et 1996). La chaîne Ii est une glycoprotéine membranaire, jouant un rôle important dans la présentation de l'antigène par les molécules de CMH II. En effet, elle permet le bon repliement de ces molécules dans le RE en les stabilisant puisqu'en son absence, la majorité des molécules de classe II s'agrègent dans le RE et n'est pas transportée vers l'appareil de Golgi (Viville *et al.*, 1993 ; Elliott *et al.*, 1994). Elle facilite leur transport du RE vers le Golgi puis vers les endosomes (Viville *et al.*, 1993 ; Elliott *et al.*, 1994) grâce à des signaux d'adressage localisés dans la région cytoplasmique de la chaîne Ii (Pieters *et al.*, 1993; Odorizzi *et al.*, 1994). Enfin, la chaîne invariante empêche le chargement des molécules de HLA de classe II par les peptides endogènes présents dans le RE et le Golgi

(Roche *et al.*, 1992) et permet donc la séparation des voies de présentation HLA de classe I et HLA de classe II (Teyton *et al.*, 1990). La chaîne Ii est progressivement dégradée dans les endosomes à partir de son extrémité C-terminale luminale (Maric *et al.*, 1994). Le mécanisme de dégradation ménagée de la chaîne Ii contrôle en même temps le transport intracellulaire des molécules du HLA de classe II et leur association avec les peptides antigéniques. Il est probable que la dégradation de l'antigène et capture par les molécules du HLA de classe II ne soient pas des phénomènes indépendants. En effet, des protéines partiellement dénaturées ou dégradées peuvent interagir avec les molécules de HLA de classe II (Runnels *et al.*, 1997) en raison de l'ouverture des extrémités du sillon de liaison des peptides. Sa dégradation se poursuivrait par digestion autour de la région protégée par la molécule HLA (Deng *et al.*, 1993). De fait, récemment, des complexes de 120 kD composés de deux molécules de HLA de classe II liées à un même long fragment antigénique ont été identifiés (Castellino *et al.*, 1998). De plus, il semble que deux types de molécules de HLA de classe II soient engagés dans la présentation (Delvig et Robinson, 1998).

Modification de l'expression par les cytokines

L'expression des molécules HLA peut être fortement augmentée par des cytokines (interferons α , β et γ , $\text{TNF}\alpha$, interleukine 4, GM-CSF) ou lors d'infections virales. Une diminution de l'expression peut être observée sur des cellules cancéreuses ou lors d'infections virales.

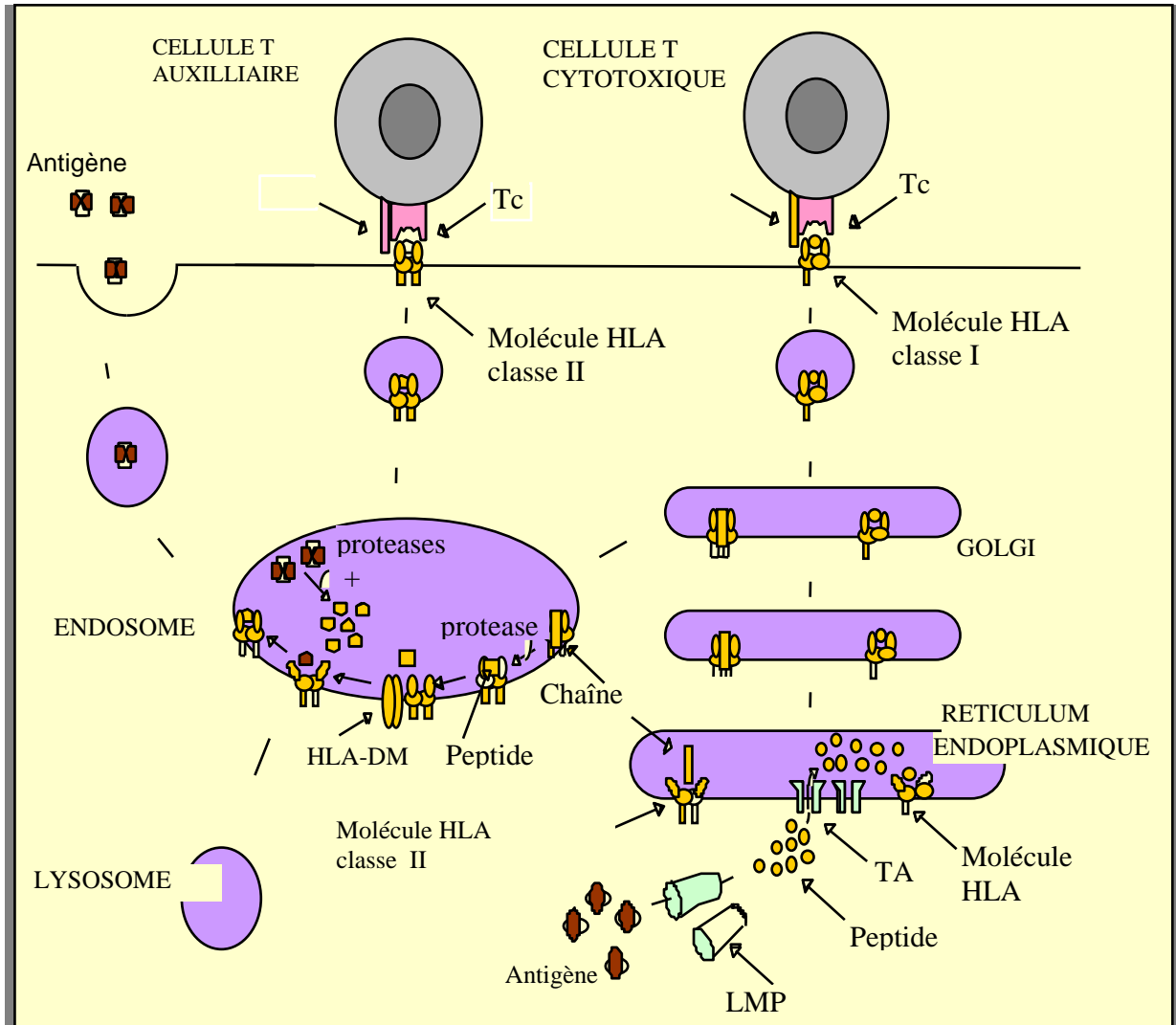


Figure N° 4 : Schéma représentatif des différentes étapes aboutissant à l'expression des molécules HLA à la membrane cellulaire (<http://www-dsv.cea.fr/thema/hla2>).

2-Le polymorphisme HLA

Le système HLA est le système le plus polymorphe de l'homme : un gène est considéré polymorphe lorsqu'il existe deux allèles dans la population avec une fréquence d'au moins 0,01% (un gène polymorphe est un gène pour lequel l'allèle le plus commun a une fréquence supérieure à 1%, les autres étant assimilés à des anomalies). Le système HLA constitue une véritable carte d'identité biologique qui permet aux mécanismes de défense immunitaire de reconnaître le "soi" du "non-soi".

Le polymorphisme des molécules HLA a d'abord été décrit par des techniques sérologiques (test de microlymphocytotoxicité complément dépendante à l'aide d'allosérum initialement décrit par Terasaki et Mc Clelland en 1964). Elles apportent une définition immunologique au phénotypage HLA. Puis la connaissance du polymorphisme a été améliorée grâce à des techniques biochimiques d'isoélectrofocalisation (IEF) puis à des techniques cellulaires (cytotoxicité à médiation cellulaire, culture mixte (CML : cell mediated lympholysis). Mais c'est surtout le développement des techniques de biologie moléculaire qui a permis et permet une bonne définition de ce polymorphisme. La technique de RFLP initialement décrite par J Bidwell (Bidwell *et al.*, 1988) a progressivement été remplacée par des techniques utilisant la réaction de polymérisation en chaîne réaction (PCR) telles que la « polymérase chain reaction sequence specific primer » (PCR-SSP), et le séquençage. Grâce à ces techniques et à la mise en place de banques de données, il est actuellement possible de connaître les différents allèles de chaque locus et la variabilité inter locus et inter allèle.

En raison de cette grande variété, il a été nécessaire d'établir **une nomenclature internationale** (Bodmer *et al.*, 1992). Cette nomenclature s'est progressivement construite grâce à des « workshops internationales » qui ont conduit à la WHO nomenclature.

Gène	HLA Class I			HLA Class II		
	A	B	C	DQA1	DQB1	DRB1
Allèles	414	728	210	28	66	413
Protéines	328	628	166	21	51	348
Nulles	31	21	5	1	1	2

Tableau N ° 1 : Nombre d'allèles spécifiques connus en 2005 pour chaque locus.
(www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html)

L'accumulation des données de séquences d'ADN et des acides aminés a permis d'établir le degré d'homologie entre les différents loci et de comparer les différents allèles d'un locus. Combinée aux études de structure tridimensionnelle, l'analyse des séquences a permis de comprendre comment les différents acides aminés influençaient la structure et la stabilité des différentes molécules HLA.

Degré de variabilité : La variabilité correspond au degré de différence entre deux allèles (ou molécules). Elle est mesurée par le pourcentage de nucléotides (ou acides aminés) différents entre les séquences considérées. La connaissance d'un nombre croissant de séquences nucléotidiques permet de préciser les régions conservées (domaine $\alpha 3$ et $\beta 2m$) et variables (domaine $\alpha 1$, $\alpha 2$) de la molécule et de définir objectivement les notions de variabilité et de polymorphisme de ces molécules.

Haplotype et déséquilibre de liaison : Dans cette région du génome il existe peu de sites de recombinaison. Aussi les gènes voisins sont transmis ensemble, et peuvent être transmis en bloc de génération en génération. Un haplotype décrit une combinaison d'allèles codés par différents loci présents sur le même chromosome. Du fait de la transmission haplotypique, certains allèles sont en déséquilibre de liaison. Ces déséquilibres varient dans les différentes ethnies, de même que la fréquence des différents allèles dans celles-ci.

Localisation des sites polymorphiques : Le polymorphisme des molécules HLA-A, B et Cw est porté par la chaîne lourde α , celui des molécules HLA-DR, DQ est localisé dans le domaine N-terminal des chaînes β et en plus α pour le DQ.

Les domaines $\beta 2 m$ et $\alpha 3$ sont conservés et les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont variables avec des régions de forte variabilité (résidus 9, 24, 41-46, 62-82, de domaine $\alpha 1$ et résidus 95-99, 114-116, 152, 156, et 163 du domaine $\alpha 2$). La molécule comporte 25% de résidus variables, et seulement 7,3% des résidus sont hypervariables. Chaque molécule est porteuse de douze à une vingtaine de sites variables reconnus par des anticorps et éventuellement par les TCR avec toutefois une préférence pour quinze résidus (Rudensky *et al.*, 1991; Chicz *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1992; Chicz *et al.*, 1993).

Les régions de grande variabilité sont situées sur l'hélice α du premier domaine et les feuillettes β des premiers et deuxièmes domaines. Le troisième domaine est conservé. Ainsi les régions variables sont, elles, localisées près du site de liaison avec le peptide et du site contact avec le récepteur T.

La formation du complexe CMH-peptide met en jeu des interactions entre certaines chaînes latérales du peptide et les poches du sillon. Les acides aminés du peptide ont été numérotés par Stern (Stern *et al.*, 1994) en fonction de leur position par rapport aux poches du site de liaison. Ainsi, le résidu en position P1 a sa chaîne latérale enfouie dans la profonde poche hydrophobe située à l'une des extrémités du sillon. Les autres résidus enfouis, ou résidus d'ancrage, sont en position P4, P6, P7 et P9. Les résidus P2, P5 et P8 pointent vers le solvant. Le résidu P3 présente une position intermédiaire. Chaque poche, en fonction de ses caractéristiques (taille, hydrophobicité, charge), accepte certaines chaînes latérales et pas d'autres, ce qui est à l'origine de la spécificité de liaison des molécules de HLA de classe II. Ainsi, dans la molécule HLA-DR1 (Stern *et al.*, 1994; Rammensee *et al.*, 1995), la profonde poche hydrophobe en P1 montre une forte préférence pour les résidus aromatiques et aliphatiques, et constitue le principal déterminant d'ancrage du peptide. Plus petites, moins profondes et moins hydrophobes, les poches P4, P6, P7 et P9 montrent des préférences moins strictes : P4 accommode des chaînes latérales aliphatiques, P6 préfère les petits résidus et P9 les résidus hydrophobes. P7, dans la molécule HLA-DR1, ne semble pas contribuer d'une façon importante à la spécificité de la molécule. D'autre part, le réseau de liaisons hydrogène permet de maintenir le peptide en contact étroit avec le HLA. De plus, comme il est indépendant de la séquence du peptide et du polymorphisme des molécules HLA, il permet d'expliquer pourquoi une molécule HLA de classe II peut lier une grande diversité de peptides différents (Figure N° 5).

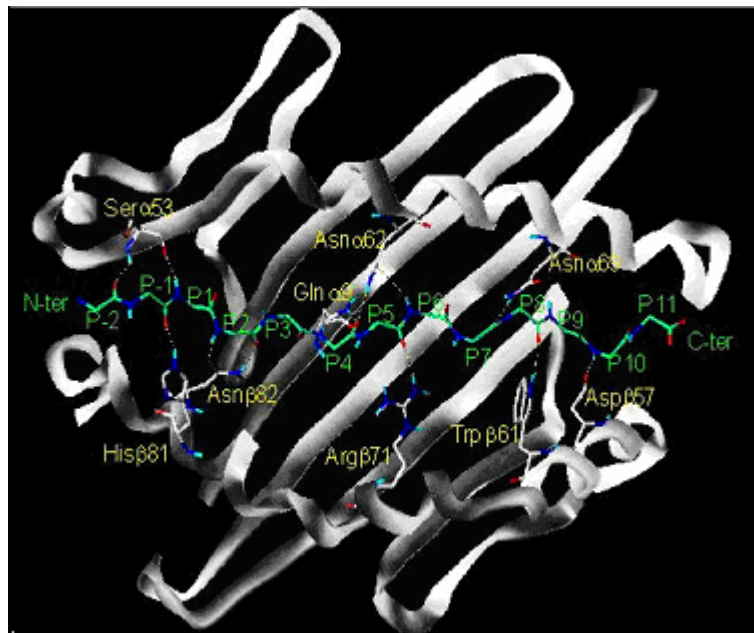


Figure N° 5 : Carte épitopique des diverses spécificités HLA de classe II ; les acides aminés sont identifiés par un code et la figure montre le réseau de liaisons hydrogène entre le squelette du peptide et la molécule de HLA de classe II (<http://www-dsv.cea.fr/thema>).

3-La fonction biologique des molécules de CMH

Les molécules de classe I présentent les antigènes aux cellules T cytotoxiques pendant que les molécules de classe II présentent les antigènes aux cellules T auxiliaires. Cette spécificité reflète une autre différence, le type d'antigène présenté. Les molécules de classe I présentent des peptides issus de la dégradation, par le protéasome, de protéines cytoplasmiques «endogènes ». Pendant que les molécules de classe II permettent aux cellules professionnelles présentatrices de l'antigène (APC pour *Antigen Presenting Cells*) comme les cellules dendritiques, de présenter aux lymphocytes T CD4+ des peptides issus de n'importe quelle protéine extracytoplasmique qui peut se concentrer dans les compartiments d'endocytose (Castellino *et al.*, 1997 ; Germain *et al.*, 1997) « exogènes ». L'activation de cellules T pourrait activer des cellules B pour produire l'anticorps qui mènerait à la destruction du pathogène.

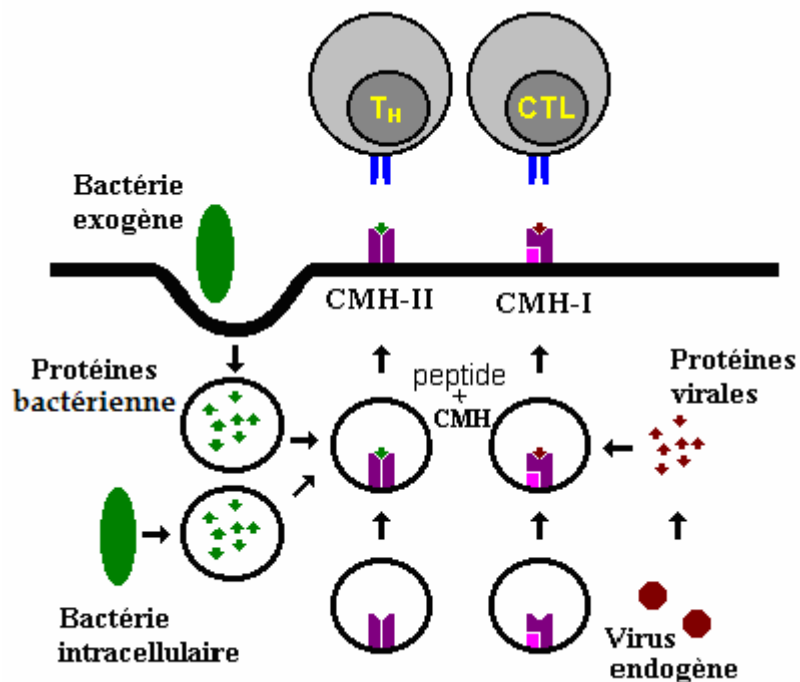


Figure N° 6 : Schéma représentatif de la fonction des molécules HLA de classe I et HLA de classe II

L'organisme humain est normalement tolérant vis à vis ses propres peptides. Cette tolérance est acquise au cours de la vie foetale par deux processus :

* L'un se déroule dans le thymus. C'est la délétion clonale ou destruction des clones lymphocytaires correspondant aux autoantigènes.

Les cellules souche d'origine médullaire se différencient en lymphocytes T dans le thymus. Au cours de leur transit de la corticale vers la médullaire, les lymphocytes T se multiplient et réarrangent les gènes de $TCR\alpha\beta$. Au contact des cellules de l'épithélium thymique les lymphocytes T capables de reconnaître les molécules HLA du soi sont sélectionnés positivement alors que ceux qui sont capables de reconnaître des peptides du soi présentés par le HLA du soi sont sélectionnés négativement au contact des cellules originaires de la moelle osseuse. La différenciation des populations $CD4+$ et $CD8+$ se fait par contact respectivement avec les molécules HLA de classe II et les molécules HLA de classe I.

* L'autre processus se déroule à la périphérie. C'est l'anergie clonale ou « information de ne pas réagir » adressée aux clones lymphocytaires survivants reconnaissable des autoantigènes.

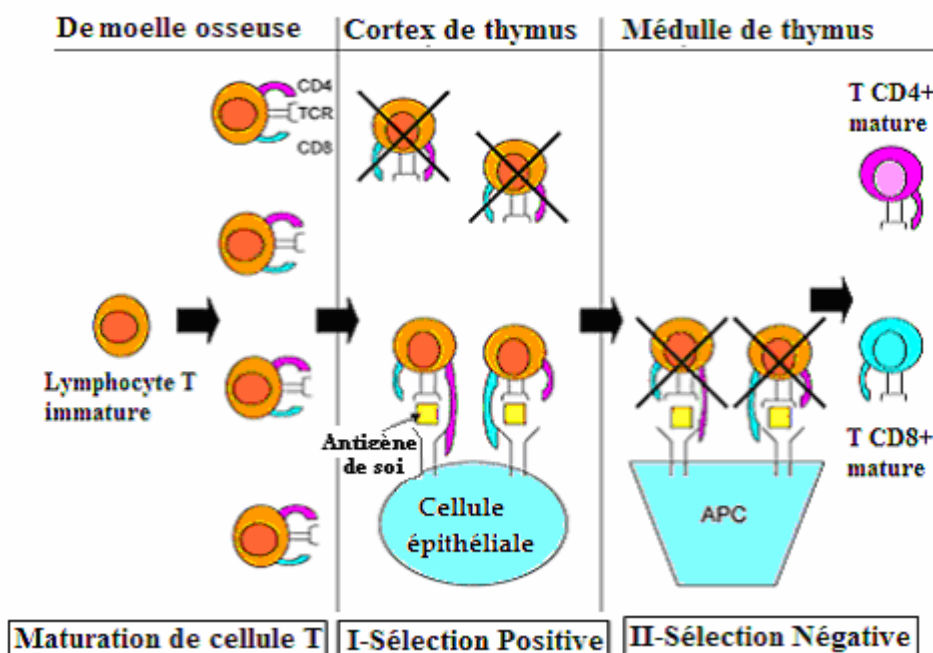


Figure N° 7 : Représentation schématisée de la tolérance centrale pendant la maturation de thymocytes (Simmons *et al.*, 2005).

Le rôle essentiel de molécules HLA concerne la réponse immunitaire. Les molécules HLA de classe I sont des molécules de restriction et de reconnaissance pour la lyse des cellules cibles par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC). Le LTC (CD8+) ne reconnaît l'antigène étranger, à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène, qu'en association avec une molécule du CMH (Zingernagel et Doherty, 1979).

Donc les molécules HLA vont chercher les peptides à l'intérieur des cellules et les transportent ensuite jusqu'à la membrane plasmique, afin de les mettre en contact avec le récepteur antigénique des cellules T. Les molécules HLA de classe I sont spécialisées dans le « ramassage » des peptides venus de l'intérieur des cellules (autopeptides, peptides viraux), auxquels elles se lient dans le réticulum endoplasmique. Les molécules HLA de classe II sont spécialisées dans le « ramassage » des peptides venus de l'extérieur des cellules (peptides bactériens, parasitaires, alimentaires, médicamenteux), auxquelles elles se lient dans les vésicules de phagocytose (figure N° 8)

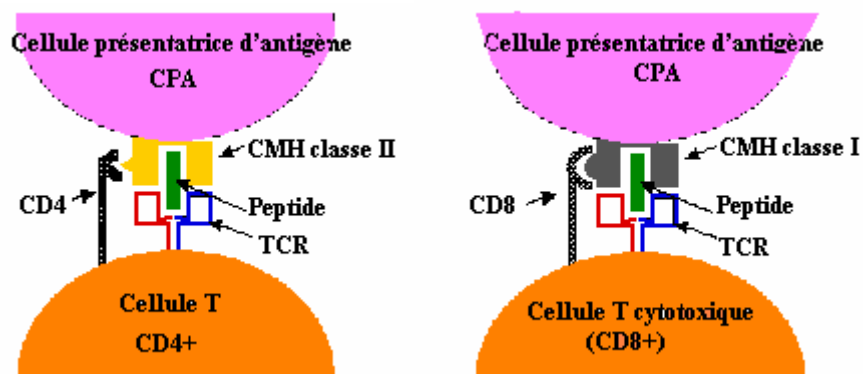


Figure N° 8 : Schéma représentatif de la fonction des molécules HLA dans la réponse immunitaire.

HLA et maladies auto-immunes :

L'implication de facteurs génétiques dans les maladies auto-immunes a été suggérée par l'observation d'une augmentation de la fréquence de ces pathologies chez les jumeaux homozygotes ou dizygotes par rapport à la fréquence dans la population générale (30 à 70 % vs 5-10%). L'implication de facteurs génétiques est encore renforcée par une plus grande fréquence de survenue de maladies auto-immunes multiples et variées dans la descendance de malades atteints de maladie auto-immunes porteurs d'allèles HLA associés à une maladie auto-immune par rapport aux membres de la famille n'exprimant pas cet allèle.

La première association de HLA et maladie a été décrite en 1969 par Kourilsky. Depuis la région HLA a été associée avec plus d'une centaine de maladies (Stewart *et al.*, 2004 ; Shiina *et al.*, 2004). Traditionnellement, la région HLA est considérée associée à une maladie si au moins un allèle présente une fréquence significativement augmentée ou diminuée par rapport à un groupe témoin. L'analyse de la région HLA élargie (HLA_x) montre que 28% des 252 gènes traduits de la région HLA_x peuvent être associés aux maladies auto-immunes (Horton *et al.*, 2004).

Le degré d'implication du système HLA semble varier considérablement d'une maladie à l'autre : ainsi l'association HLA avec le diabète de type 1 est fortement marquée alors qu'elle est faible pour la sclérose en plaque. Il faut noter que d'autres gènes que ceux de la région HLA peuvent être impliqués dans ces pathologies.

La fréquence d'un antigène HLA peut être augmentée dans la population malade par rapport à celle observée dans la population témoin (allèle associé), diminuée (allèle protecteur) ou identique (allèle neutre).

L'existence d'un fort déséquilibre de liaison entre les loci de la région HLA rend souvent difficile l'identification des allèles associés à une maladie auto-immune. Cette difficulté est encore accrue avec l'analyse de la région HLA élargie. Ainsi, certaines associations initialement décrites s'avèrent secondaires. Par exemple, le diabète de type 1 a initialement été décrit comme associé au locus HLA-B, puis DRB1. Actuellement, le locus DQB1 est considéré comme le locus conférant un risque majeur mais en association avec les gènes DRB1, DQA1, les gènes de classe III, et la région HLA de classe I élargie.

Divers mécanismes peuvent contribuer à l'implication du système HLA dans l'auto-immunité, en particulier ceux impliquant la présentation des peptides à des lymphocytes T

- présentation de neo épitopes liés à des modifications post transcriptionnelles :
- réaction croisée ou mimétisme moléculaire par des agents infectieux
- modification de l'interaction peptide et poche
- modification de l'expression des molécules HLA à la surface des cellules (Garrido *et al.*, 1997)

Présentation de neo épitopes liés à des modifications post transcriptionnelles :

La majorité des protéines de mammifères présente des modifications post transcriptionnelles (MPT) qui peuvent conduire à la formation de néoantigènes. Diverses modifications ont été rapportées : l'addition ou la modification d'acides aminés, des modifications de la glycosylation, méthylation ou phosphorylations des protéines, désamination ou citrullisation de la protéine, protéolyses extracellulaire. Ces modifications peuvent être induites par des enzymes ou survenir de façon spontanée (Anderton *et al.*, 2004). Ces néoantigènes pourront stimuler les lymphocytes T grâce aux récepteurs T de forte affinité. Pour exemple, les antigènes impliqués dans la maladie coeliaque sont des composants du gluten de blé. La désamidation de la gliadine par la transglutaminase stimule plus fortement les clones de lymphocytes T cytotoxiques HLA-DQ2 isolés à partir du tubes digestifs de patients atteints de maladie coeliaques. La désamidation d'une seule glutamine suffit à augmenter l'affinité du peptide pour la molécule HLA-DQ2 (Arentz-Hansen *et al.*, 2000).

Interaction peptide et poche :

Les allèles DRB1*03 sont fréquemment associés aux pathologies auto-immunes (DID, lupus, thyroidite.) alors que les allèles DRB1*07 ont un effet protecteur. Ces allèles diffèrent par la présence d'arginine en position β 74 de la poche de la molécule DR3 alors que la molécule DR7 présente une glutamine à cette localisation.

En effet, l'extrême diversité des produits des gènes HLA et le caractère quasi-individuel de la combinaison des antigènes, expliquent les variations d'un individu à l'autre de la réponse immunitaire. Qu'un individu possède un allèle du système HLA qui lui permet, du fait de sa constitution et de sa structure tridimensionnelle, de présenter tel peptide étranger, il sera donc répondeur, alors qu'un autre ne possédant pas le même allèle en sera incapable et sera donc non-répondeur. Ceci est la conséquence du phénomène de restriction et montre bien que les molécules HLA servent de marqueurs d'identité. C'est cette particularité qui est, sans doute, à la base des différentes susceptibilités individuelles à de nombreuses affections.

D'autre côté, il faut pas oublier que **les maladies auto-immunes sont polyfactorielles** : si la fréquence d'apparition d'une maladie auto-immune chez un jumeau monozygote est fortement augmentée, cette fréquence n'est pas de 100%. Ceci signifie que son développement nécessite la conjonction de facteurs génétiques et de facteurs non génétiques, tel que des facteurs environnementaux. Si on désigne par x la prévalence d'une maladie dans une population donnée et par y le pourcentage de concordance de l'affection chez les jumeaux vrais monozygotes, on constate que :

- y est nettement supérieur à x , ce qui implique l'existence de gènes de susceptibilité.
- y reste nettement inférieur à 100 %, ce qui montre que la possession des gènes de susceptibilité ne suffit pas pour entraîner la maladie.

Pour expliquer une pénétrance incomplète, il faut donc faire appel à des facteurs non génétiques, tel que des facteurs issus de l'environnement, qu'ils soient chimiques, alimentaires, infectieux ou autres.

Donc l'association de maladies auto-immunes et le système HLA n'étant jamais absolue, des critères précis de signification statistique doivent être respectés. L'association est étudiée dans une population de sujets non apparentés comportant des individus présentant la pathologie étudiée et des individus témoins normaux. Une probabilité que l'association soit due au hasard est calculée, ainsi que le risque relatif (RR).

III- Les systèmes de cohésion de peau :

La cohésion de l'épiderme est principalement assurée par les desmosomes qui permettent l'adhésion des kératinocytes entre eux, et par des filaments et fibrilles d'ancrage, les hémidesmosomes qui participent à la jonction dermo-épidermique (JDE) et assurent une bonne adhésion entre l'épiderme et le derme sous-jacent.

1- Systèmes de cohésion au sein de l'épiderme :

Au sein de l'épiderme, la cohésion inter kératinocytaire est assurée par des complexes multiprotéiques formés de protéines d'adhésion de surface (cellule adhésion molécules : CAM) qui relient la surface des cellules et le cytosquelette qui est un réseau de fibres, également appelé lamina, qui parcourt le cytoplasme, il soutient la cellule, détermine sa forme et permet l'ancrage des organites et de certaines enzymes dans le cytoplasme.

Les protéines transmembranaires appartenant à la famille des cadhérines sont concentrées au niveau des desmosomes et des jonctions d'adhérences (Kowalczyk *et al.*, 1999 ; Garrod *et al.*, 2004).

Le desmosome est un système de jonction intercellulaire des épithéliums, il est également présent dans le myocarde, l'arachnoïde et la pie mère (Machet *et al.*, 1994). Il représente le premier complexe majeur d'adhésion des kératinocytes et joue un rôle primordial dans le maintien de la stabilité de l'architecture tissulaire (North *et al.*, 1999), dans le développement embryonnaire normal (Cheng *et al.*, 2004) et dans les communications intercellulaires. Dans la peau humaine, la densité des desmosomes par rapport à la surface des kératinocytes augmente de la couche basale à la couche granuleuse où elle est maximale. Leur densité décroît ensuite jusqu'à la superficie du stratum corneum. Le desmosome est constitué de 2 parties :

- La plaque desmosomale qui permet de relier le desmosome aux kératines du cytosquelette. Elle est composée de protéines cytoplasmiques non glycosylées tels que la plakoglobine, la plakophiline et les desmoplakines I et II.
- Le core, portion intercellulaire des desmosomes, constitué de deux familles de protéines glycosylées transmembranaires, appartenant à la grande famille des cadhérines (Amagai, 1991): les desmoglénines (1 et 3) et les desmocollines (1 et 3) qui assurent, par l'intermédiaire

de leur domaine extracellulaire, l'ancrage intercellulaire. La fixation à la plaque desmosomale cytoplasmique est, elle, assurée par son domaine intracellulaire (Getsios *et al.*, 2004).

Le deuxième complexe majeur d'adhésion inter kératinocytaire est constitué par les **jonctions d'adhérence** (Nykvist *et al.*, 2001 ; Perez-Moreno *et al.*, 2003) : les jonctions gap et les jonctions serrées qui contribuent aux échanges intercellulaires, et les jonctions intermédiaires qui sont des complexes formés de cadhérines (E-cadhérine « épithélium », P-cadhérine « placenta ») et de molécules cytoplasmiques (plakoglobine, α et β caténine, vinculine) qui, en se liant au cytosquelette plasmique, jouent un rôle majeur dans le maintien de la stratification épidermique.

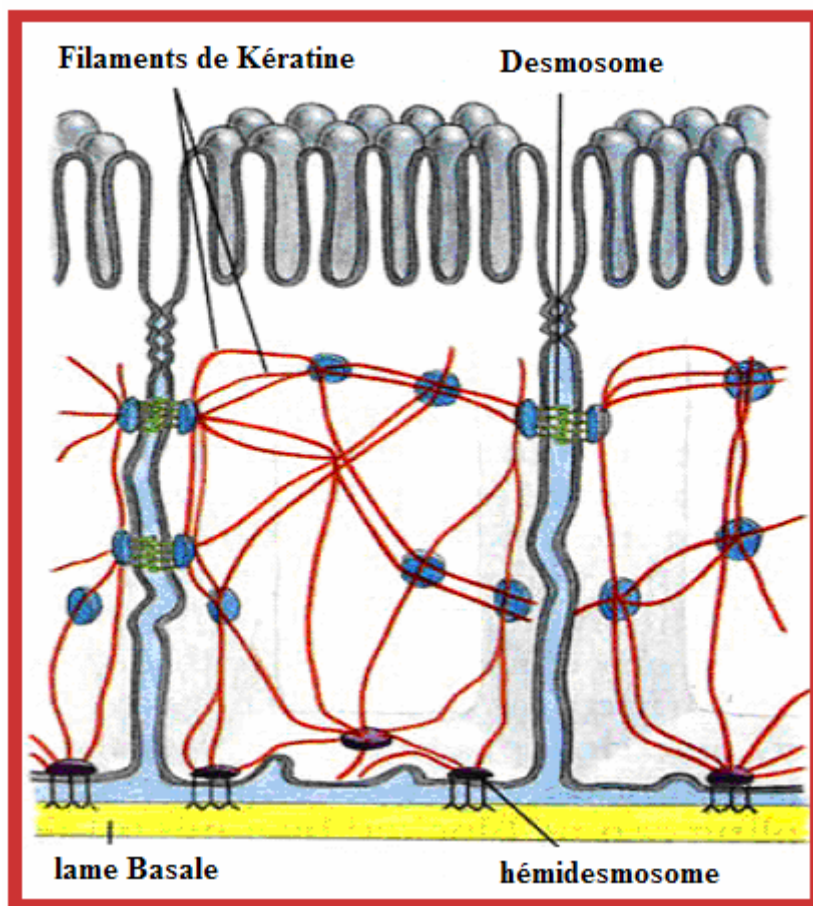


Figure N° 9 : Distribution des desmosomes et des hémidesmosomes dans les cellules épithéliales (Wilson et Hunt, 2004).

2- Systèmes de cohésion entre le derme et l'épiderme :

L'adhérence dermo-épidermique est assurée au niveau d'une région complexe d'environ 100 nanomètre : la zone de la membrane basale ou jonction dermo-épidermique qui est essentiellement constituée de molécules produites par les kératinocytes (collagènes, glycoprotéines, protéoglycanes, protéines liant le calcium) (Burgeson *et al.*, 1997 ; Salmon Her *et al.*, 1998 ; Quondamatteo *et al.*, 2002). Les études moléculaires et génétiques des dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) ont contribué à la caractérisation des constituants moléculaires de cette jonction dermo-épidermique, ainsi qu'à une meilleure compréhension de leurs fonctions (Borradori *et al.*, 1999 ; Zambruno *et al.*, 1999) et à la mise en évidence d'une association entre les altérations des hémidesmosomes et la survenue de certaines DBAI (Borradori *et al.*, 1996). Au cours de différentes pathologies affectant cette structure, il a été démontré que le mode d'expression variait selon le site touché au niveau de ces hémidesmosomes qui assurent non seulement l'adhésion entre la membrane basale cytoplasmique des kératinocytes du derme et la membrane basale sous jacente qui contient des fibrilles d'ancrage, mais aussi un rôle majeur dans la transmission des signaux de la matrice extracellulaire vers le compartiment intracellulaire (Bernard *et al.*, 1997 ; Borradori *et al.*, 1996 ; Eimpl *et al.*, 1996).

La microscopie électronique différencie plusieurs structures de la jonction dermo-épidermique qui sont de la superficie vers la profondeur :

- Les hémidesmosomes, qui sont répartis sur la membrane plasmique du pôle basal des kératinocytes, correspondent à une densification de cette membrane. Ils comprennent une plaque dense intracytoplasmique dite plaque d'ancrage sur laquelle convergent des filaments intermédiaires de kératine ou tonofilaments, la membrane cytoplasmique et une ligne dense extracellulaire fine, parallèle à la membrane cytoplasmique dont elle est séparée par un espace.
- La membrane basale épidermique constituée de la lamina lucida qui surmonte la lamina densa. Elle est traversée par des filaments d'ancrage plus visibles en regard des hémidesmosomes. La lamina lucida ne serait pour certains qu'un espace virtuel correspondant à un artefact de fixation (Chan *et al.*, 1993). Les fibrilles d'ancrage sont des structures curvilinéaires, avec une striation horizontale, qui naissent perpendiculairement sous la lamina densa. Elles se terminent par endroits par des

structures dermiques appelées plaques d'ancrage. Elles s'associent à des microfibrilles élastiques et à des fibres de collagène.

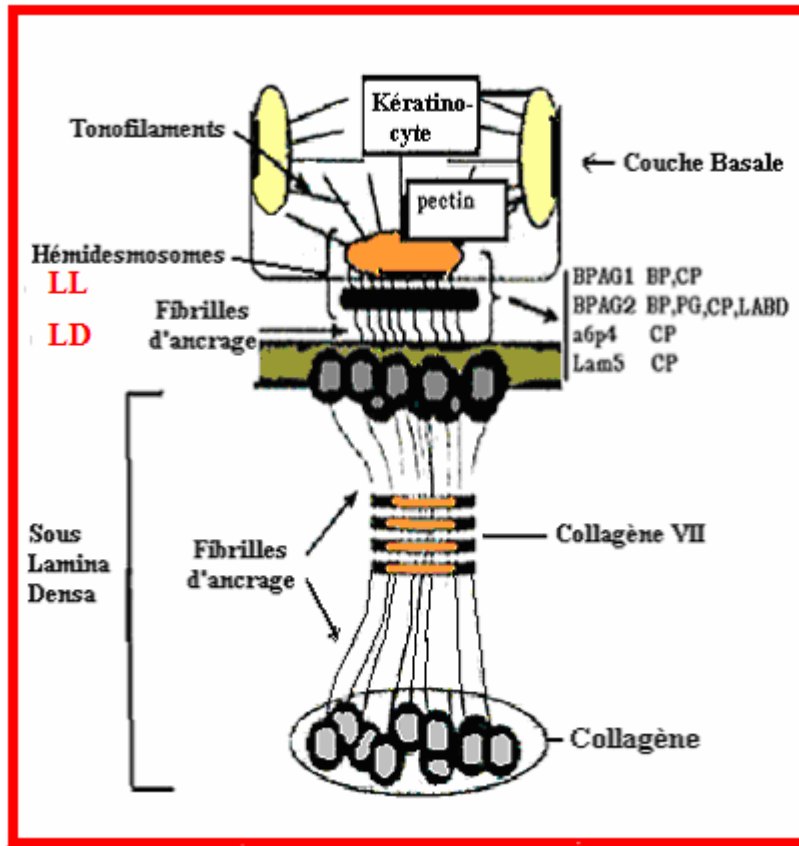


Figure N° 10 : Structure schématique de la jonction dermo-épidermique d'après Zambruno (Zambruno *et al.*, 1999).

On y observe quatre étages distincts comprenant (du haut en bas)

- La membrane basale des kératinocytes basaux avec leurs hémidesmosomes,
- La lamina lucida, espace clair aux électrons, traversée par les filaments d'ancrage,
- La lamina densa, zone dense aux électrons,
- La zone fibrillaire sous-basale, constituée essentiellement de fibres d'ancrage.

Les principaux composants des hémidesmosomes et de la membrane basale épidermique individualisés sont des protéines **cytoplasmiques** appartenant à la famille des plakines tels que l'antigène de la pemphigoïde bulleuse 230 (Ag PB230 ou BPAg1) et la plectine qui vont permettre de relier les filaments de kératine à la plaque cytoplasmique des hémidesmosomes (Favre *et al.*, 2001).

- **L'antigène BP230** (Ag BP230 ou BP AgI), reconnu par la majorité des sérums de malades atteints de pemphigoïde. Le gène codant la protéine BP 230 est situé sur le bras court du chromosome 6 en position 6p11-12 (Matsuzaki *et al.*, 2003). C'est une protéine spécifique de la jonction dermo-épidermique, localisée à la partie interne de l'hémidesmosome au niveau de la plaque d'insertion des filaments intermédiaires (Ishiko, 1993). Elle est formée de deux domaines globulaires séparés par un domaine central alpha hélicoïdal. Le domaine globulaire C-terminal contiendrait des séquences répétitives homologues à celles de la desmopakine et de la plectine.
- **La plectine**, l'IFAP300 et l'antigène HD 1 (500 kDa) sont des molécules en association étroite avec les filaments intermédiaires de kératine. Seul l'antigène HD1 paraît être spécifique des hémidesmosomes.

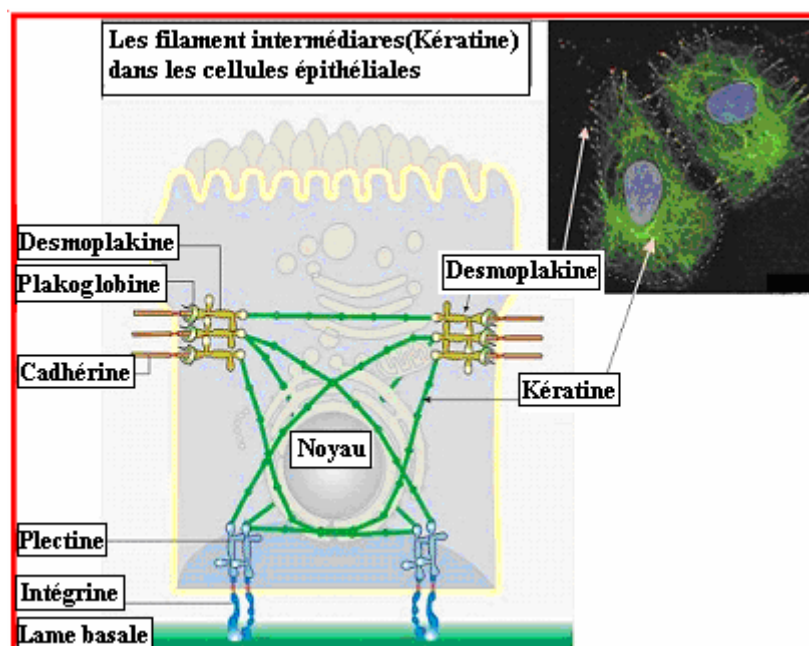


Figure N° 11 : Protéines de filaments intermédiaires dans les cellules épithéliales fortement impliqués dans deux types de jonctions d'ancrage :

- le desmosome, interaction cellule-cellule
- le héli-desmosome, interaction cellule-lame basale.

Des composants **transmembranaires** :

- **L'antigène de la pemphigoïde bulleuse 180** (Ag BP 180 ou BPAg2 aussi dénommé collagène type XVII) qui traverse la lamina lucida et contribue à la formation des filaments d'ancrage (Van den Bergh *et al.*, 2003) et l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ qui jouent un rôle crucial dans la formation des hémidesmosomes et dans l'interaction des kératinocytes basaux avec les protéines de la membrane basale.
- **Les intégrines** sont des récepteurs trans-membranaires hétérodimériques. L'intégrine $\alpha_6\beta_4$ est constituée de la sous-unité α_6 et de la sous-unité β_4 . Elle se lie à la laminine-1 mais possède une affinité plus forte pour la laminine-5 (Niessen *et al.*, 1994). Cette intégrine est indispensable à l'établissement de complexes d'ancrage stables dans la jonction dermo-épidermique. L'absence de domaine α_6 empêche toute liaison avec les laminines alors que sa portion extracellulaire permet l'adhésion de l'intégrine avec le domaine NC16A de l'AgBP180. La sous-unité β_4 joue un rôle important dans l'ancrage de l'intégrine à la plaque de l'hémidesmosome (Spinardil *et al.*, 1995). Elle possède des similitudes avec le domaine cytoplasmique de l'AgBP180, ce qui suggère un second site d'interaction entre ces molécules.
- Les protéines intrinsèques de la membrane basale épidermique sont constituées d'éléments ubiquitaires et de composants ayant une spécificité tissulaire, parmi elles : **les laminines** qui sont des glycoprotéines non collagéniques de grande taille et de structure hétérotrimérique. Elles sont composées de 3 chaînes polypeptidiques α , β et γ , génétiquement distinctes. Les 3 sous-unités de chaque molécule de laminine s'assemblent pour former une croix asymétrique composée d'un bras long constitué des extrémités N-terminales des trois sous-unités, et de trois bras courts constitués chacun de l'extrémité C-terminale de chaque sous-unité. Il existe 11 isoformes de laminine ; seules deux ont été formellement identifiées dans la membrane basale épidermique: la laminine-5 ($\alpha_3\beta_3\gamma_2$), et la laminine-6 ($\alpha_3\beta_1\gamma_1$).
- **Le collagène IV** est l'élément structural le plus important des membranes basales. Il constitue la charpente moléculaire de la lamina densa. Non spécifique de la jonction dermo-épidermique, le collagène IV est une macromolécule formée de protomères composés de 3 chaînes polypeptidiques.
- **Le nidogène ou entactine** est une glycoprotéine dont le gène est situé sur le chromosome 1q43 (Fox *et al.*, 1991 ; Mayer *et al.*, 1995). Cette molécule est un composant ubiquitaire des membranes basales, localisé essentiellement dans la lamina

densa et la partie basse de la lamina lucida de la jonction dermo-épidermique (Horiguchi *et al.*, 1989). Elle sert de liaison stable entre la laminine-6 et le collagène IV.

- **Le collagène VII** est le composant principal des fibrilles d'ancrage. Son gène est situé sur le chromosome 3p21 (Payen *et al.*, 1989). Il est spécifique des membranes basales de l'épiderme, des épithéliums de malpighie et de la cornée.

L'organisation supramoléculaire de la membrane basale est, elle, sous la dépendance de deux réseaux : le premier formé autour des laminines 5 (précédemment connues comme nicéine, kalinine ou épilégrine) et des laminines 6 qui sont des glycoprotéines formées de 3 chaînes (α , β et γ) qui participent à la formation des complexes d'ancrages comprenant les hémidesmosomes (qui interagissent avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ sur le versant épidermique), les filaments et les fibrilles d'ancrages (dont le composé principal est le collagène VII qui interagit avec la laminine 5 sur le versant dermique). Le deuxième réseau est formé autour du collagène de type IV de la lamina densa.

IV - Dermatoses bulleuses auto-immunes :

Les dermatoses bulleuses auto-immunes constituent un groupe de maladies acquises caractérisées par l'existence d'auto-anticorps qui vont se fixer *in vivo* au niveau de protéines qui assurent la cohésion de l'épiderme. Cette fixation entraîne une altération de la fonction adhésive de ces protéines, avec comme traduction clinique majeure la formation de bulles cutanées.

Deux grands groupes doivent être distingués selon le type de clivage, lequel dépend des antigènes-cibles atteints par la réaction auto-immune :

- Les dermatoses bulleuses auto-immunes intra-épidermiques caractérisées, par la perte de cohésion des kératinocytes entre eux. Elles résultent généralement de l'altération des desmosomes par les auto-anticorps et elles forment le groupe des pemphigus.
- Les dermatoses bulleuses auto-immunes sous-épidermiques, caractérisées par la perte de l'adhésion entre le derme et l'épiderme. Elles résultent de l'atteinte de la jonction dermo épidermique, le plus souvent du fait de l'altération d'une de ses structures par les auto-anticorps, par exemple l'hémidesmosome dans la pemphigoïde bulleuse.

Dermatoses bulleuses auto- immunes sous-épidermiques :

Ce groupe de pathologies est caractérisé cliniquement par la présence de bulles, de vésicules, d'érosions, de cicatrices, cutanées ou muqueuses, et histologiquement par un clivage sous-épidermique. Sur le plan immunologique, il est caractérisé par l'existence de dépôts *in vivo* d'anticorps anti-membrane basale, détectables en immunofluorescence directe, et par la présence inconstante d'auto-anticorps circulants dirigés contre les déterminants antigéniques de la membrane basale, détectés par immunofluorescence indirecte.

Il s'agit d'un ensemble de pathologies qui comprend : la pemphigoïde bulleuse (PB), la pemphigoïde cicatricielle (PC), l'épidermolyse bulleuse acquise (EBA), la pemphigoïde gestation (PG), la dermatose à IgA linéaire. Elles ont un critère immunologique commun : elles présentent toutes des dépôts linéaires d'immunoglobuline G (IgG) de sous classe IgG1 et IgG4 (Suzuki *et al.*, 1992 ; Laffite *et al.*, 2001), et/ou de complément (C3, parfois C4 C1q), et parfois d'immunoglobuline A (IgA) le long de la zone de la membrane basale de l'épiderme. Ces pathologies diffèrent par leurs cibles antigéniques. Le diagnostic précis de chacune de ces pathologies ne peut être effectué que par la confrontation des données cliniques, morphologiques, et immunochimiques.

Pemphigoïde bulleuse (PB) :

C'est la plus fréquente des dermatoses bulleuses auto-immunes dont elle représente 70% des cas (Bernard *et al.*, 1995). Elle touche surtout les sujet âgés (âge moyen : environ 70 ans), et est exceptionnelle chez les enfants (Arechalde *et al.*, 1999) avec un mortalité estimée de 11 à 30 % selon les séries (Bernard *et al.*, 1995 ; Roujeau *et al.*, 1998 ; Colbert *et al.*, 2004).

Sur le plan morphologique, il existe des dépôts linéaires d'IgG et/ou de C3 le long de la membrane basale en immunofluorescence directe, parfois associés à de l'IgA. En l'immuno microscopie électronique directe, les dépôts sont sur le pôle basal des kératinocytes basaux et dans la lamina lucida (Prostn *et al.*, 1987). En immuno microscopie électronique indirecte, les anticorps spécifiques se fixent sur le versant interne des hémidesmosomes (Bedane *et al.*, 1990) et notamment l'antigène de la pemphigoïde bulleuse 230 (Ag PB 230 ou BPAg1) et l'antigène de la pemphigoïde bulleuse 180 (Ag PB180 ou BPAg2 aussi dénommé collagène type XVII) (Arechalde *et al.*, 1999 ; Giudice *et al.*, 1992). Ces deux antigènes sont des composants fondamentaux pour la cohésion dermo-épidermique.

Le domaine immunogénique dominant de la PB180 (PB180 NC16A) reconnu par le sérum des patients atteints de pemphigoïde bulleuse est adjacent à la membrane plasmique des hémidesmosomes (Zillikens *et al.*, 1997 ; Döpp *et al.*, 1990). La démonstration du caractère pathogène des anticorps anti-BP 180 a été apportés chez le souriceau nouveau né par une étude de transfert passif d'anticorps de lapin dirigés contre la partie homologue chez la souris de l'épitope immunodominant de l'Ag BP180 humain (NC16A), ce transfert passif reproduisant alors chez le souriceau les lésions cliniques, histologiques et immunopathologiques de la pemphigoïde bulleuse (Liu *et al.*, 1993,1997, 2000 ; Sitaru *et al.*, 2004).

La pemphigoïde cicatricielle (PC)

C'est une affection caractérisée par l'atteinte sélective des muqueuses et la formation ultérieure de cicatrices atrophiques. Elle touche surtout le sujet âgé. Les lésions cutanées sont inconstantes et souvent peu nombreuses (Thomas *et al.*, 2000). Il existe des formes mono symptomatiques avec l'atteinte d'une seule muqueuse notamment buccale ou oculaire (Chan *et al.*, 2002 ; Bernard *et al.*, 2004).

Sur le plan morphologique, il existe des dépôts linéaires d'IgG et/ou de C3 le long de la membrane basale en IFD, parfois associés à de l'IgA.

En immunofluorescence directe, ces dépôts immuns sont épais et irréguliers, situés à la fois dans la partie basse de la lamina lucida et sur la lamina densa (Bernard *et al.*, 1990).

En l'immuno microscopie électrique indirecte, les dépôts sont situés sur la lamina densa et dans la lamina lucida, mais laissant toujours un espace clair sous la membrane des kératinocytes basaux (Bedane *et al.*, 1991).

La détermination biochimique des protéines cibles n'a été réalisée qu'en Western blot. Le principal antigène cible identifié est Ag BP 180 (BPAg2) au niveau NC16A, comme dans la pemphigoïde bulleuse (Labib *et al.*, 1986 ; Bernard *et al.*, 1992 et al.; Schmidt *et al.*, 2001), mais également au niveau de la partie C-terminale du domaine extracellulaire de la BP 180 (Nakatani *et al.*, 1998 ; Hashimoto *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2003). Les autres antigènes cibles sont la laminine 5 (Lazarova *et al.*, 2001), la laminine 6 (Chan *et al.*, 1997), le collagène VII et la chaîne $\beta 4$ de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, essentiellement dans les atteintes oculaires (Leverkus *et al.*, 2001 ; Bhol *et al.*, 2003).

La pemphigoïde cicatricielle oculaire (PCO) est particulièrement grave en raison du risque principal de cécité. Le début de la maladie peut être insidieux ou subaigu affectant, d'abord la conjonctive puis la cornée. L'atteinte est lentement progressive au stade précoce de la maladie, cependant l'évolution ultérieure peut être rapide et grave.

La classification de Tauber et Poster (Tauber et Poster, 1992) permet de distinguer quatre stades cliniques:

- Stade I: au début une conjonctive banale, érythémateuse, qui laisse secondairement apparaître une fibrose sous-conjonctivale entraînant un processus cicatriciel destructeur créant brides, adhérences et synéchies ;
- Stade II : une diminution de profondeur des culs-de-sac conjonctivaux inférieurs ou supérieurs ;
- Stade III : apparition de symblépharons (adhérence paupière globe oculaire) ;
- Stade IV : lorsque la fibrose devient totale (soudure partielle ou totale des bords palpébraux).

Les lésions cicatricielles sont en plus responsables d'entropion et de trichiasis. Ce processus évolutif peut s'accélérer de façon spontanée ou être déclenché par un traitement médical (corticoïdes locaux), voire un acte chirurgical sur la cornée ou la conjonctive.

La pemphigoïde gravidique (herpès gestationnelle) (PG)

Elle touche entre 1/3000 et 1/50000 grossesses et il s'agit d'une éruption bulleuse, non cicatricielle, de la femme enceinte, assez semblable à la PB. En immunofluorescence directe, ces dépôts linéaires de C3 le long de la zone de la membrane basale de l'épiderme, parfois associés à de l'IgG (Kelly *et al.*, 1994).

Sur le plan biochimique, les antigènes cibles, étudiés en Western blot et en immunoprécipitation, sont les mêmes que dans la PB : l'Ag PB230 et surtout l'Ag PB180 et notamment l'épitope NC16A (Lin *et al.*, 1999 ; Sitaru *et al.*, 2003) et la partie C-terminale de BP 180 (Shimanovich, 2002).

L'épidermolyse bulleuse ancrée (EBA)

C'est une maladie très rare qui débute habituellement vers 30-40 ans et réalise un tableau clinique similaire aux épidermolyses bulleuses héréditaires de type dystrophique. Elle est due à l'existence d'auto-anticorps dirigés contre le collagène VII, constituant des fibres d'ancrage de la jonction dermo-épidermique. Elle est exceptionnelle chez l'enfant.

Sur le plan morphologique, il existe des dépôts linéaires d'IgG et/ou de C3 le long de la membrane basale, parfois associés à de l'IgA. En immunofluorescence directe les dépôts d'immunoréactants sont situés sous la lamina lucida, dont ils sont séparés par un espace clair (Bedane *et al.*, 1991 ; Prost *et al.*, 1989). En immunofluorescence indirecte, les anticorps spécifiques se fixent à la partie inférieure de la lamina densa, et dans la zone des fibres d'ancrage (Bedane *et al.*, 1991).

La caractérisation biochimique des protéines cibles est identique en Western blot et en immunoprécipitation : il s'agit de deux antigènes de 145 kDa et 290 kDa, constituants du procollagène VII (Woodley *et al.*, 1986).

La dermatose à IgA linéaire (DL IgA)

Elle se caractérise par une éruption bulleuse chronique d'aspect très variable, en peau normale ou érythémateuse évoluant souvent chez l'enfant, plutôt localisée à la partie inférieure du tronc. Les bulles ont souvent un groupement herpétiforme. L'association avec une entéropathie au gluten, en règle asymptomatique, est moins fréquente que la dermatite herpétiforme.

Sur le plan morphologique, cette pathologie se distingue des autres par un critère histologique formel : il existe, en immunofluorescence directe, un dépôt linéaire exclusif d'IgA, le long de la membrane basale.

En immunofluorescence directe, les dépôts d'IgA sont contre la lamina densa, et sur la membrane des kératinocytes basaux, prenant parfois un aspect bipolaire (Prost *et al.*, 1989).

Sur le plan biochimique, l'antigène cible serait une protéine de 97 kDa et 120 kDa, (Allen *et al.*, 2003) et les auto-anticorps reconnaissent des épitopes de la région NC16A mais également des épitopes proches de cette région (Zone *et al.*, 1998 ; Zillikens *et al.*, 1999) et la partie C-terminale (John *et al.*, 1998 ; Roh *et al.*, 2000).

Antigène et anticorps anti BP180 :

L'antigène de 180 kD (AgBP180 ou BPAg2) : est une glycoprotéine transmembranaire avec une extrémité C-terminale contenant quinze domaines collagéniques et seize domaines non collagéniques de longueurs variables (Giudice *et al.*, 1992 ; Zillikens *et al.*, 2002). La pathogénicité des auto-anticorps anti BP 180 a été établie sur modèle animal (Liu *et al.*, 1993 ; Xu *et al.*, 2004).

Le gène codant la protéine BP 180 est situé sur le bras long du chromosome 10 (10q24.3) (Zillikens *et al.*, 2001). L'extrémité N-terminale de la protéine se situe dans l'hémidesmosome, la partie C-terminale est située à la partie inférieure de la lamina lucida et participe à la formation des filaments d'ancrage reliant les hémidesmosomes à la lamina densa.

Cette protéine comporte plusieurs sites antigéniques.

Le site antigénique majeur de BP 180 est localisé sur une région non collagénique juxta et extra membranaire, de 73 acides aminés, appelée NC16A (Giudice *et al.*, 1992). Cette région NC16A a été découpée en plusieurs fragments d'environ quinze à vingt acides aminés. La partie la plus immunogène du domaine NC16A est la portion adjacente à la membrane basale des kératinocytes, qui est reconnue par 90 % des sérums des patients atteints de pemphigoïde bulleuse (Zillikens *et al.*, 1997 ; Nakatani *et al.*, 1998). Il a été montré que les sérums de malades atteints de pemphigoïde bulleuse ayant des auto-anticorps dirigés contre BP 180 reconnaissent des épitopes (de 10 à 20 acides aminés) différents à l'intérieur de la région NC16A (Zillikens *et al.*, 1997). Ils peuvent plus rarement reconnaître des épitopes mineurs de la portion extracellulaire de BP180 en dehors de la région NC16A (Hata *et al.*, 2000), en

général les anticorps contre la partie NC16 sont plus fréquents que ceux contre la partie C-terminale (Silk *et al.*, 2002).

Dans la pemphigoïde cicatricielle, les auto-anticorps dirigés contre BP 180 reconnaissent des épitopes de la région NC16A mais également de la région C-terminale 4575 (Balding *et al.*, 1996 ; Bédane *et al.*, 1997 ; Hirako *et al.*, 2003).

Les anticorps anti BP180 sont observés non seulement dans le sérum de patients atteints de pemphigoïdes bulleuses, pemphigoïde cicatricielle mais aussi de pemphigoïde gravidique, de dermatose à IgA linéaire et de lichen plan pemphigoïde (Zillikens *et al.*, 1999). La recherche d'auto-anticorps circulants dirigés contre l'antigène BP 180 a un double intérêt :

- **Intérêt diagnostique** (Olivry *et al.*, 2000 ; Kobayashi *et al.*, 2002) : lorsque les anticorps circulants sont absents, il est parfois difficile de faire le diagnostic différentiel avec l'épidermolyse bulleuse acquise. Seule l'immunomicroscopie électronique directe peut alors faire la différence. Cependant cette technique est une technique longue et coûteuse et nécessite une grande expérience pour l'interprétation des images. La mise au point d'une technique plus sensible, rapide, reproductible et indépendante de l'opérateur permettrait de suivre l'évolution du taux d'anticorps circulants anti-BP180. Elle permettrait également de faire le diagnostic différentiel avec l'épidermolyse bulleuse acquise lorsque le taux d'anticorps circulants est faible.

- **Intérêt pronostique** : pour la prise en charge des malades puisque le taux des auto-anticorps circulants anti BP 180 a pu être corrélé à l'activité de certaines maladies comme PB (Schmidt *et al.*, 2000 ; Amo *et al.*, 2001) et CP (Leverkus *et al.*, 2002). La corrélation du taux d'anticorps anti BP180 NC16A et de l'activité de la maladie n'a été montrée que dans la pemphigoïde bulleuse où les auto-anticorps circulants sont détectés dans 70% des cas. Dans la pemphigoïde cicatricielle, les auto-anticorps sériques sont détectés dans moins de 50% des cas et à des taux faibles.

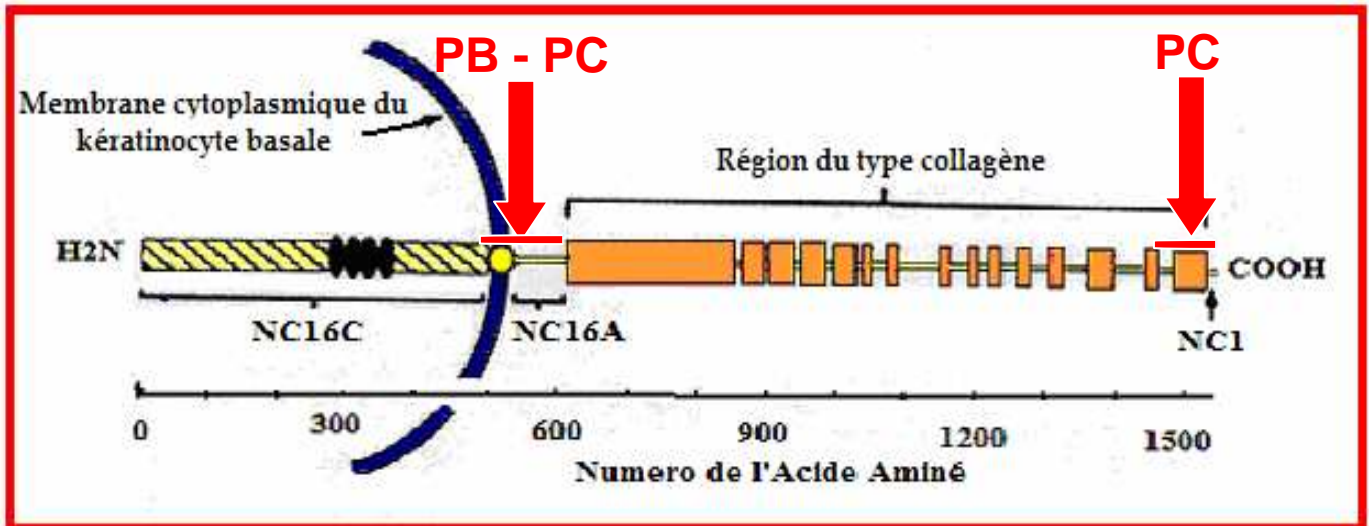


Figure N° 12 : Structure de la protéine transmembranaire BP180 ou BPAg2 (George *et al.*, 1992 ; liu *et al.*, 1995).

- Le peptide BP 180-NH₂: De 488 à 585 aa
 - constitue dans l'hémidesmosome
 - comprend une partie intra cellulaire, la partie transmembranaire et NC16A
- Le peptide BP180-COOH : De 1399 à 1530 aa
 - constitue à la partie inférieure de la lamina lucida

V- Implication du système HLA dans les dermatoses bulleuses auto-immunes

L'association HLA et DBAI a été décrite aussi bien dans le groupe des pemphigus, dermatoses bulleuses auto-immunes intra-épidermiques, que le groupe des pemphigoïdes, dermatoses bulleuses auto-immunes sous-épidermiques.

Immunogénétique et pemphigus :

Les études immunogénétiques ont été initiées chez les sujets d'origine juive en raison de la forte incidence de cette pathologie dans cette population. Dans cette population, Kuffer, a observé une fréquence plus élevée de l'allèle HLA-A26 (split de A10), HLA-B13, HLA-B38, HLA-DR4 (Kuffer , 1987). Ces associations sont la traduction d'une augmentation de la fréquence de l'haplotypes HLA-B38 DR4 DQ8 (Ahmed *et al.*, 1991). Ces données ont été confirmées par les résultats de typages en biologie moléculaire. Lombardi a montré que plus de 90% de ces malades juifs ashkénazes possédaient l'haplotype HLA-DRB1*0402, DQB1*0302. Dans d'autres groupes ethniques, comme les japonais, les allèles DR14 et DQB1*0503 seraient plus fréquents. Les fréquences de DRB1*0402, DRB1*1401 et de DQB1*0503 étaient significativement plus importantes chez les italiens non juifs (Lombardi *et al.* , 1996).

Delgado a distingué deux populations de pemphigus vulgaire, chacune ayant son propre marqueur : la première constituée des juifs ashkénazes dont l'allèle dominant serait HLA-DR4 et la seconde population regroupant les japonais, les hindous et ceux aux ancêtres européens non juifs où l'allèle DR14 prédominerait (Delgado, 1996). De plus, il a remarqué que l'allèle DQB1*02 était en fréquence moindre chez les malades et que ceux qui sont porteurs des allèles DQB1*0302 et DQB1*0503 pourraient être candidats à la production d'anticorps dans le pemphigus vulgaire.

Immunogénétique et pemphigoïde

Une association HLA et pemphigoïde est décrite en 1989 par Zaltas sur une cohorte de 70 patients atteint d'PCO : il observe une augmentation de la fréquence des allèles DR4 (43% chez les patients, vs 18% dans le groupe control), DR5 (PCO 41% vs 16%), DQw3 (57vs 31%) (Zaltas *et al.*, 1989). Cette observation n'est pas confirmée par Venning (Venning *et al.*, 1989) sur une étude portant sur 16 patients de PC. L'apparition des techniques de biologie moléculaire permettra dès 1991 à l'équipe d'Ahmed de montrer que l'allèle HLA-

DQB1*0301 confère une prédisposition génétique à cette maladie (Ahmed *et al.*, 1991). Cette association sera confirmée dans les populations caucasiennes dans les pemphigoïdes cicatricielles, avec atteintes oculaires, orales et muqueuses par diverses équipes (Oyama *et al.*, 2006 ; Carrozzo *et al.*, 2001 ; Drouet *et al.*, 1998 ; Chan *et al.*, 1997 ; Delgado *et al.*, 1996 ; Yunis *et al.*, 1994). Ces études sont résumées dans le tableau n° 2.

Notre laboratoire a montré, sur une étude portant sur 50 patients, que si l'haplotype DRB1*1101 DQB1*0301 conférait une forte susceptibilité à la PC (24% vs 6,6% dans le groupe contrôle), l'haplotype DRB1*0701 DQB1*0202 avait un effet protecteur (0% in CP vs 12,7 % dans le groupe control).

Une prédisposition conférée par HLA-DQB1*0301 a également été décrite en 1996 dans la pemphigoïde bulleuse par Delgado (fréquence 35,7 % vs 16,1 % dans le groupe control) (Delgado, 1996). Delgado a observé aussi une augmentation moins significative de la fréquence des allèles HLA-DQB1*0302,*0303, *0602, *0603). Il a suggéré que cette association est liée à la présence de la séquence des acides aminés en position 71-77 des molécules HLA DQB1. Ces associations n'ont pas été observées sur une étude portant sur 108 patients par Taylor (Taylor *et al.*, 1993). Dans une étude anglaise de 58 BP, l'association HLA DQB1*0301 n'est observée que dans la population masculine (Banfield *et al.*, 1998). Aucune de ces études ne montre une association entre la présence d'auto anticorps anti membrane basale et le système HLA.

Une prédisposition des allèles a été décrite dans d'autres types de pemphigoïde. Une augmentation significative de l'haplotype HLA-B8 DR3 chez l'enfant est reconnue dans la dermatose à IgA linéaire (DL IgA). Dans le Pemphigus foliacé une augmentation de A26, DR4 et de DRB1 (Moraes *et al.*, 1991) a été observé. Une association HLA-DR3 et DR4 a été décrite dans la pemphigoïde gravidique (Shornick *et al.*, 1995).

Ils ont montré que les molécules HLA-DR et DQ pourraient être impliquées dans la PC grâce à leur aptitude à présenter des peptides dérivés de la protéine BP180 aux lymphocytes T, en addition des modifications de l'expression des molécules HLA au niveau de la conjonctive dans le PCO, qui pourraient être impliquées dans le développement de la PC.

Cette prédisposition liée aux antigènes HLA dans les pemphigoïdes peut s'expliquer par la capacité des antigènes HLA de classe II, exprimés à la surface de cellules présentatrices d'antigènes, à activer les antigènes aux lymphocytes T. Le nombre de cellules de Langerhans

est augmenté dans l'épiderme des malades atteints de PB (Nestor, 1987). Ces cellules pourraient internaliser les protéines de la jonction, telle que BP 180, et présenter ces peptides aux lymphocytes T, pour générer une réponse immune en présence des facteurs de costimulation. La présence de clone T spécifique de BP 180 a été détectée chez des patients atteints de PB (Lin *et al.*, 1999 ; Budinger *et al.*, 1998). La protéine BP 180 est présente dans le thymus. L'existence de pathologies auto-immunes ayant pour cible cette protéine laisse à penser qu'il existe une rupture de la tolérance vis-à-vis de BP 180.

Auteurs, année publication	Nombre de patients inclus dans l'étude	Phénotype HLA prédisposant à la maladie	Phénotype HLA protecteur
Zaltas <i>et al.</i> , 1989	70 PCO	DR4 43% patients ; 18% contrôles, DR5 41% patients ; 16% contrôles, DQw3 57% patients ; 31% contrôles	
Venning <i>et al.</i> , 1989	32 PB 16 : PC	Pas d'association est trouvée	
Ahmed <i>et al.</i> , 1991	20 PCO	DQw3 (p = 0,006), DQw7, DQB1*0301(RR = 9,6)	
Yunis <i>et al.</i> , 1994	22 OP, 17 PCO	DQB1*0301, 38,6% OP (p = 0,0047) vs 52,9% PCO (p = 0,0001) DRB1*04 , *0101, DQA1*03 PCO (p = 0,0001) vs OP (p = 0,0012)	
Delgado <i>et al.</i> , 1996	21 BP, 17 PCO, 22 OP	DQB1*0301 (p = 0,005, p < 0,0001, p =0,001), *0302,*0303, *0602, *0603 (p = 0,01)	
Chan <i>et al.</i> , 1997	21 PC 11 PB	DQB1*0301 76% (16/21 PC) p < 0,005, Pas d'association est trouvée en BP	
Drouet <i>et al.</i> , 1998	25 PC	DRB1*1101(24%) DQB1*0301(54%) RR = 4,23	DRB1*0701 DQB1*0202 RR = 0,19
Carrozzo <i>et al.</i> , 2001	28 pemphigoïde	DQB1*0301 RR = 28,73	
Oyama <i>et al.</i> , 2006	124 pemphigoïde	DQB1*0301, DRB1*04, DRB1*11,	

Tableau N° 2 : Récapitulatif des études HLA et pemphigoïdes.

Objectifs de travail:

Notre travail a porté sur deux aspects de l'implication du système HLA dans les pemphigoïdes bulleuses.

1. Le phénotype HLA influence-t-il la réponse humorale anti BP 180 ?
2. Quel est l'effet des cytokines, impliquées dans l'PCO, sur l'expression des molécules HLA de classe II à la surface des cellules conjonctivales ?

Le phénotype HLA influence-t-il la réponse humorale anti BP 180 ?

Les anticorps anti BP 180 sont observés dans toutes les formes de pemphigoïdes. Cependant ces anticorps reconnaissent des épitopes différents dans les pemphigoïdes bulleuses et cicatricielles.

Notre laboratoire a démontré dans notre population une association HLA de classe II avec les 2 formes les plus courantes de pemphigoïdes (Drouet *et al.*, 1998).

Nous nous sommes demandé si le phénotype HLA de classe II des malades pouvait influencer la réponse humorale vis-à-vis des anti BP 180. Pour répondre à cette question, nous avons développé un test ELISA vis-à-vis de 2 épitopes de la protéine BP 180. Puis nous avons analysé la présence de ces anticorps en fonction du phénotype HLA des patients par une étude rétrospective.

Quel est l'effet des cytokines, impliquées dans l'PCO, sur l'expression des molécules HLA de classe II à la surface des cellules conjonctivales ?

La fibrose observée dans la PC serait en partie due à la sécrétion de TGF- β . Cette cytokine diminue l'expression des molécules HLA de classe II sur les cellules lymphoïdes. Notre équipe a observé la présence d'une expression de molécules HLA-DR et DQ sur les biopsies de kératinocytes de patients atteints de pemphigoïdes cicatricielles, alors que cette expression est absente sur les biopsies de peau de sujets sains (Delpuguet, 1999). Cette expression des molécules HLA de classe II nous paraît contradictoire avec les connaissances du rôle immunomodulateur du TGF- β sur l'expression des molécules HLA de classe II. Nous avons analysé *in vivo* l'expression des molécules HLA sur les cellules conjonctivales de patients atteints de PC par immunofluorescence sur des empreintes oculaires. En parallèle, nous avons comparé l'influence de 3 cytokines (IFN γ , TNF α et TGF- β) sur une lignée conjonctivale et une lignée lymphoïde.

MATERIELS ET METHODES

Matériel :

Sérums : Notre étude est une étude retrospective effectuée en utilisant les sérums de sérothèque du service de dermatologie. Nous avons utilisé des sérums de patients atteints de pemphigoïde bulleuse, de témoins positifs contenant des auto-anticorps dirigés contre BP 180, détectés par immunoblot sur extrait épidermique, et de témoins négatifs (sérums des sujets sains ne contenant pas d'anticorps dirigés contre la protéine BP 180 en immunoblot).

Recherche d'anticorps anti BP180

Les recherches d'anticorps anti BP180 ont été effectuées sur des extraits de peau par la technique du Western blot selon un protocole déjà établi dans le laboratoire de dermatologie, et par la technique d'ELISA, protocole que nous avons développé. Nous avons pu établir des tests ELISA spécifiques des parties carboxy terminale (COOH) et transmembranaire (TM) de la protéine BP180 à l'aide de peptides de fusion. Le développement de ce test était identique pour les deux peptides COOH et TM.

Pour la production des peptides recombinants, un produit PCR codant le fragment d'intérêt a été amplifié à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par transcription inverse d'ARN totaux extraits de kératinocytes, cellules exprimant la protéine BP180. Le produit PCR est inséré dans un plasmide puis transféré dans *Escherichia coli* (*E.coli*). Après le contrôle de l'insertion du transcrit BP180 par séquençage de l'ADN extrait des colonies d'*E.coli*, la protéine de fusion est extraite des bactéries et purifiée par un passage sur colonne de chromatographie d'affinité.

A- Recherche d'anticorps anti BP180 par ELISA

1- Choix du vecteur et principe:

Nous avons choisi le plasmide pGEX-5X-1 pour produire les protéines de fusion. Ce système utilise la Glutathion S-transférase (GST) pour permettre l'expression et la purification des protéines recombinantes produites dans *E.coli*. Le système est basé sur l'expression inductible de fragments de gènes fusionnés avec le gène de GST conduisant à la production de protéines

de fusion contenant la GST en N-terminal et le peptide d'intérêt en C-terminal qui s'accumulent en grande quantité dans le cytoplasme des cellules.

Les protéines fusionnées à la GST sont construites en insérant un fragment de gène dans le site de clonage du vecteur pGEX-5x-1 (Amersham Pharmacia). L'ADNc est amplifié par PCR avec des amorces contenant des sites de restriction appropriés de manière à pouvoir cloner le produit de PCR entre ces sites dans le vecteur d'expression pGEX-5X-1, en phase avec la séquence codant la glutathione S-transférase (GST). L'expression est placée sous le contrôle du promoteur *tac*, induit par l'analogue du lactose isopropyl β -D thiogalactoside (IPTG). Le produit de ce gène est une protéine répresseur qui lie la région de l'opérateur du promoteur *tac*, empêchant l'expression de la protéine de fusion en l'absence d'IPTG. Ceci permet un contrôle très fin de l'expression des protéines recombinantes. La construction est insérée dans une souche de *E. coli* mise au point pour l'expression de protéines recombinantes. Des essais d'expression à petite échelle sont menés sur quelques dizaines de clones, de façon à sélectionner un clone présentant un bon rendement avant de passer à l'expression sur un grand volume de culture bactérienne. Le culot bactérien est récupéré par centrifugation. Les bactéries sont lysées et les protéines solubles récupérées à partir du surnageant. Le surnageant est passé sur une colonne d'agarose-GSH, puis lavé pour éliminer les protéines contaminantes, pour enfin éluer la protéine de fusion. La pureté de la préparation est examinée en SDS-PAGE, et l'activité de la protéine recombinante est vérifiée par un test approprié.

2- Préparation et contrôle des inserts :

2-1- Extraction des ARN m

L'ARNm a été extrait soit à partir d'une biopsie de peau obtenu sur des résidus opératoires et des cultures de kératinocytes à l'aide du kit 'Extract-all® (Amersham) selon les recommandations du fabricant. En résumé, 50-100 mg de peau ou 5-10 millions de cellules sont lysées dans l'Extract-all. Après homogénéisation, le produit est incubé à température ambiante pendant 5 min, pour permettre une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après addition de chloroforme (20% du volume initial), le mélange est agité vigoureusement pendant 15 secondes puis laissé se reposer à température ambiante pendant 2 à 3 minutes. L'homogénat est centrifugé à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. Après centrifugation l'homogénat est séparé en trois phases: la phase inférieure phénol-chloroforme rouge, l'interphase de couleur blanchâtre et la phase aqueuse supérieure qui est

incolore. Les ARNs restent exclusivement dans la phase aqueuse alors que les ADN et les protéines sont dans l'interphase et la phase organique. La phase aqueuse est transférée dans un tube propre (sans RNase) et on rajoute 0,5 ml d'isopropanol pour 1 ml d'Extract-all utilisé pour l'homogénéisation. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 5-10 min ; après une centrifugation à 12000g pendant 10 min à 4°C, les ARN forment un précipité blanchâtre au fond du tube. Le culot est lavé avec de l'éthanol à 75%, à raison de 1 ml pour 1 ml d'Extract-all utilisé, par centrifugation à 7500g pendant 5 min à 4°C. Finalement le culot d'ARN est repris dans 50 µl d'eau stérile. L'ARN total extrait doit faire l'objet d'un contrôle quantitatif qui s'effectue par mesure de densité optique au spectrophotomètre à 260 nm :

Concentration de l'ARN = DO 260nm x facteur de dilution (500) x 40 µg/ml.

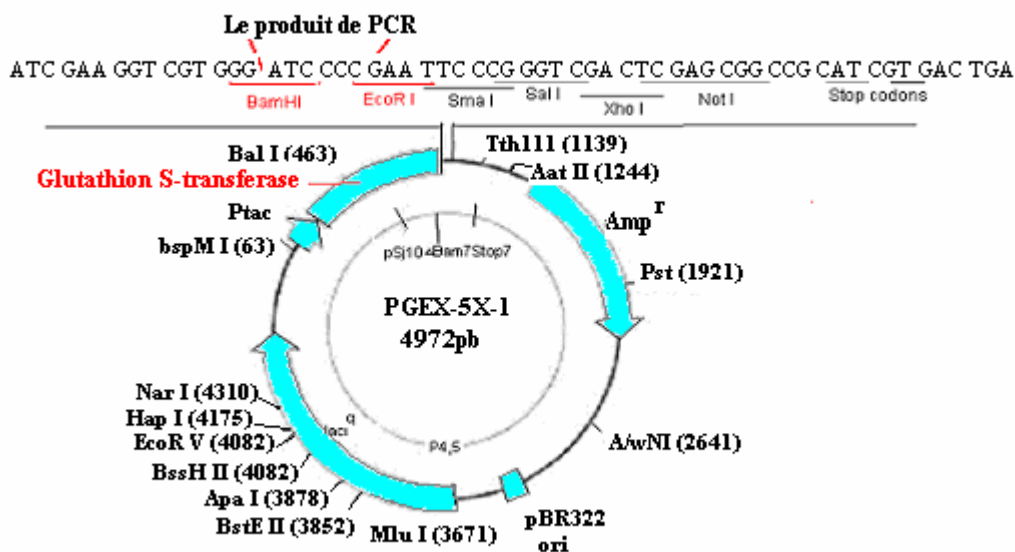


Figure N° 13 : Schéma représentant le plasmide PGEX-5X-1

2-2-Production d'ADNc par Transcription inverse (Transcription inverse :RT)

2-2-1-Principe de la transcription inverse

La transcription inverse permet la synthèse du brin d'ADN complémentaire à un brin d'ARN (messenger ou non), aboutissant à la formation d'une molécule hybride : ARN/ADN. Cette synthèse est réalisée à l'aide d'enzyme extrait chez certains virus et nécessite l'apport d'une amorce permettant l'initiation (Oligo (dT), hexamère ou amorce spécifique). Nous avons utilisé comme amorce pour la transcription inverse un Oligo(dT) qui permet une hybridation uniquement sur la queue polyA à l'extrémité 3' des ARN messagers.

2-2-2-Protocole expérimental

Afin de générer des fragments d'ADN complémentaire simple brin à partir des ARN totaux, une transcription inverse est réalisée avec le kit « SuperScript™ II Reverse Transcriptase ® » (Invitrogen). Dans un tube eppendorf dépourvu de nucléases, 1 à 5 µg d'ARN total est ajouté à 1 µl d'Oligo (dT) (500 µg/ml), et le volume est complété à 12 µl avec de l'eau distillée. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 10 min et immédiatement placé dans la glace pendant 2 min. Après une brève centrifugation, on ajoute 4 µl du tampon enzymatique (First Strand Buffer® 5X.) (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) Ensuite, un mélange de 2 µl de DTT 0,1 M (Gibco) et 2 µl de dNTP à 10 mM chacun (Pharmacia), est ajouté.

Le tube est chauffé à 42°C pendant 2 min et, après avoir bien homogénéisé son contenu, 1 µl de SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 unités) (10000U, soit 200U/µl, Gibco) est ajouté en pipetant délicatement afin de bien délivrer la totalité de l'enzyme et l'échantillon est placé à 42°C pendant 50 à 90 min, température optimale de l'activité de l'enzyme.

La réaction est inactivée en chauffant à 70°C pendant 15 min. A la fin de la manipulation, 1 µl (2 unités) de RNase H peut être ajouté afin d'éliminer totalement les ARN résiduels. L'échantillon est alors incubé à 37°C pendant 20 min puis repris dans 20 µl d'eau dépourvue de RNases. Les ADNc peuvent être conservés à - 20°C ou directement utilisés en PCR.

2-3-Amplification d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

2-3-1-Principe de la PCR

La méthode d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été mise au point par Saiki et collaborateurs (Saiki *et al.*, 1985). Elle permet la synthèse rapide et fidèle de copies multiples d'un ADN dit « matriciel » à partir d'un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifique de l'ADN à amplifier. L'ADN contenant le segment à amplifier est chauffé à une température supérieure à sa température de dénaturation (94-95°C) en

présence des composants nécessaires à la réplication. Cette température est maintenue entre trente secondes et une minute. Elle est ensuite abaissée à une valeur inférieure à la température de dénaturation de l'amorce possédant la plus faible température de dénaturation, afin que les amorces puissent s'hybrider avec l'ADN dénaturé; elle est maintenue entre trente secondes et une minute. On augmente ensuite la température à 72°C. Cette température est habituellement supérieure à la température de dénaturation des amorces, ce qui permet à la polymérase de commencer l'élongation des amorces avant que la température de l'élongation ne soit atteinte. Le fragment synthétisé est alors suffisamment long pour que sa température de dénaturation soit supérieure à 72 °C. La durée de cette étape varie en fonction de la longueur de la séquence à amplifier.

Ces trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) constituent un « cycle » au cours duquel la quantité d'ADN cible a doublé. Ces cycles sont répétés entre trente et quarante fois suivant la quantité de départ et la longueur de l'ADN cible.

2-3-2-Protocole expérimental

Les amplifications ont été réalisées sur un appareil PERKIN ELMER 9700.

Les amorces et les conditions de PCR sont résumées dans le tableau N° 3

Amorce séquence	Le programme PCR (30 cycles)	Longueur
<p>Sens BP 180 COOH (à parti de 4197) 5'-GGG ATC CCC GCT GAC TTT GCT GGA GAT CTG-3'</p> <p>Anti-sens Bp 180 COOH : 5'-CGG GAA TTC CTT GCT GAT GCC GGG TGG-3'</p>	<p>Dénaturation à 94C° 45 sec</p> <p>Hybridation à 52C° 45 sec</p> <p>Elongation à 72C° 45 sec</p>	393 bp
<p>Sens Bp 180 NH2 : (à parti de 1466) 5'-GGG ATC CCC TGG TGC CCCTGC GGC TCC TGC-3'</p> <p>Anti-sens Bp 180 NH2 : 5'-CGG GAA TTC GAG CTC CTC CTG GCT GTC ACT-3'</p>	<p>Dénaturation à 94C° 45 sec</p> <p>Hybridation à 54C° 45 sec</p> <p>Elongation à 72C° 45 sec</p>	290bp
<p>Sens pGEX: 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'</p> <p>Anti-sens pGEX: 5'- CGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'</p>	<p>Dénaturation à 94C° 45 sec</p> <p>Hybridation à 55C° 45 sec</p> <p>Elongation à 72C° 45 sec</p>	

Sens Actine : TTCGTGGATGCCACAGGAC	Dénaturation à 94C° 30sec	284 bp
Anti-sens Actine : TACCTCATGAAGATCCTCA	Hybridation à 55C° 45 sec	
	Elongation à 72C° 30 sec	

Tableau N° 3 : Les amorces et les programmes utilisés pour les PCR

2-3-3-Contrôle du produit de PCR sur un gel d'agarose :

Les fragments d'ADN peuvent être séparés par électrophorèse en gel d'agarose en fonction de leur taille. La concentration en agarose est adaptée en fonction de la taille des fragments que l'on souhaite séparer.

L'agarose mélangé avec du tampon TAE (1X) (Tris-acétate pH 8,0 40 mM, EDTA 1 mM) ou TBE (1X) (Tris-borate pH 8,0 89 mM, EDTA 2 mM) est dissout par chauffage. Avant d'être coulé, du Bromure d'Ethidium (BET) à 0,5 µg/ml final, est ajouté pour permettre la visualisation ultérieure des fragments d'ADN, en éclairant le gel aux ultra violets (UV) de 254 à 300 nm. Le tampon de charge est ajouté aux échantillons pour faciliter leur dépôt dans le gel et pour permettre de suivre la migration.

Dans le cas où le produit de PCR doit être extrait de l'agarose après la séparation électrophorétique, la bande d'intérêt est découpée à l'aide d'un scalpel sur la table UV en respectant quelques précautions particulières: la propreté du matériel électrophorétique pour éviter toute contamination, une exposition limitée en temps aux UV.

3- Ligature de l'insert dans le plasmide :

3-1-Principe de la ligature

Une ligature peut être effectuée soit avec des extrémités franches soit avec des extrémités cohésives. Le plasmide circulaire est clivé avec une seule ou plusieurs enzymes de restriction pour produire un fragment d'ADN linéaire avec des extrémités franches ou cohésives. Ces extrémités laissent toute possibilité au fragment de se replier sur lui-même lors d'une ligature. Pour empêcher le vecteur de se ligaturer sur lui-même après son traitement par l'enzyme de restriction, une déphosphorylation est pratiquée, qui enlève les groupements 5' phosphate nécessaires à la liaison avec les extrémités 3' hydroxyles. L'enzyme utilisée est la phosphatase alcaline de crevette, SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (Promega). Puis l'insert est ligaturé dans le plasmide.

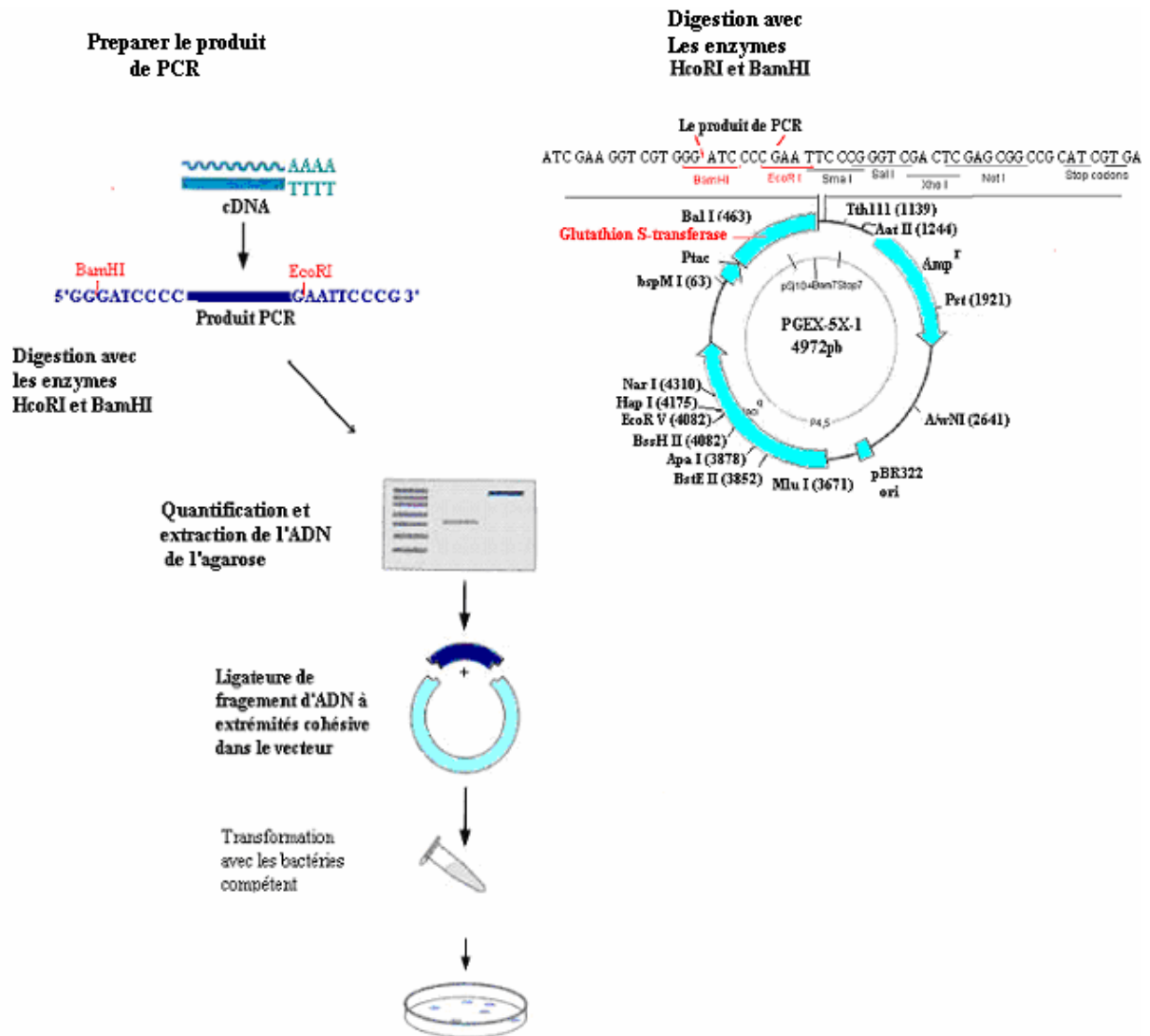


Figure N° 14 : Schéma montrant la ligature de l'insert dans le plasmide.

3-2-Protocole expérimental :

3-2-1-Protocole de digestion : L'ADN à digérer par une enzyme de restriction (le vecteur et les produits de PCR) est incubé en présence d'un tampon 10X adapté à l'enzyme et de la quantité d'enzyme adéquate (on compte 1U d'enzyme pour 1 µg d'ADN à digérer), le plus généralement à 37°C pendant 2h à 4h. Lorsque le vecteur est ouvert avec une seule enzyme de restriction, ses extrémités 5' sont déphosphorylées.

Pour présenter des extrémités compatibles, le vecteur et les produits de PCR à insérer sont digérés avec des enzymes de restriction (*Bam HI* et *EcoRI*).

Afin d'insérer des sites de restriction aux extrémités du fragment à cloner nous avons utilisé des amorces contenant les sites de restriction appropriées en 5' (1 ou 2 bases supplémentaires en 5' sont ajoutées aux amorces utilisées pour protéger les sites de restriction d'une éventuelle activité exonucléasique de la *Taq* polymérase.

Donc on a coupé l'ADN avec l'enzyme *EcoRI* en premier et pour réaliser la seconde coupure par l'enzyme *BamHI* (nécessitant un tampon différent de *EcoRI*) on a pratiqué une extraction suivie d'une précipitation à l'éthanol en milieu NaAc 0,3M pH 7,0.

Le résultat de la digestion enzymatique est contrôlé et dosé par l'électrophorèse sur un gel d'agarose.

3-2-2-Séparation et isolement d'un fragment d'ADN par électrophorèse : La totalité du produit de digestion enzymatique est séparée par migration sur un gel d'agarose en présence du témoin de masse moléculaire. Le fragment d'intérêt, séparé du reste du vecteur digéré, est repéré grâce au marqueur de masse moléculaire et est découpé avec l'agarose. La bande d'intérêt est purifiée de l'agarose à l'aide du kit « QIAquick Gel Extraction ® » (QIAGEN) en respectant les consignes du fabricant. La bande d'agarose (400 mg au maximum) contenant l'ADN est dissoute à 50°C pendant 10 min dans un tube Eppendorf contenant 3 volumes de tampon du kit pour un volume de gel (100 mg \cong 100 µl). Après dissolution complète de l'agarose, un volume d'isopropanol est ajouté. Le mélange est homogénéisé, puis déposé sur une colonne Qiagen pour être centrifugé pendant 1 min à 10000 x g. Ainsi l'ADN est adsorbé sur la membrane de silice de la colonne. Après 2 lavages en tampon PE, l'ADN est élué de son support par addition de 30 µl d'eau ou de tampon EB, incubation pendant 5 min à température ambiante et centrifugation pendant 1 min à 10000 x g.

3-3-Ligatures de fragments d'ADN à extrémités cohésives dans le vecteur : La ligature se déroule dans un très petit volume (20 µL) et à basse température, de façon à faciliter le rapprochement des extrémités cohésives de l'insert et du vecteur, et l'action de la T4-ADN ligase. Cinquante à quatre cent nanogrammes de vecteur digéré purifié sont mis en présence d'un excès d'insert digéré purifié (0,1-1 µg), dans du tampon de ligation (Tris-HCl 300 mM pH 7,8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10mM), 1 µL de T4-DNA ligase (Promega), qsp 20 µL. La solution est incubée à 16°C dans un bain-marie pendant la nuit.

4-Production des peptides par les bactéries :

4-1 Souches bactériennes

Les bactéries utilisées comme hôtes pour les vecteurs sont :

- pour le clonage des fragment d'ADN *E.coli* TG1 (*supE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB)* ; F' [*traD36 proAB⁺ lacIq lacZΔM15*]).
- pour l'expression de protéine *E.coli* JM 105 et BL21 (F⁻,ompT,hsdS_(rB,mB)gal)

Ces bactéries sont stockées à -80°C dans du glycérol 35% final. À partir de ce stock la souche bactérienne est étalée sur une boîte de milieu minimum. Cette boîte peut être conservée pendant 2 mois à 4°C.

4-2-Préparation de bactéries compétentes

Une préculture d'une colonie de TG1, JM105 ou BL-21 est réalisée pendant la nuit dans 10 ml de milieu de Luria Bertani (LB) sous agitation à 37°C. Cette préculture est diluée au 1/100 dans du LB et agitée à 37°C jusqu'à une absorbance de 0,3-0,4 à 600 nm. La culture est centrifugée (10 min, 5000xg), le culot bactérien est récupéré puis resuspendue dans 1/10 du volume initial dans du TSS IX.

4-3-Transformation des bactéries par un plasmide

4-3-1-Principe

Le plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline, donc les bactéries sont étalées sur des boîtes LBA, les clones ayant intégré une construction plasmique sont donc résistants à l'antibiotique de sélection, et l'IPTG agit comme inducteur du gène lacZ tandis que le X-Gal permet de mettre en évidence la présence d'une activité β-galactosidase en donnant une réaction colorée.

Ces boîtes sont alors placées à l'étuve (37°C) jusqu'à l'apparition de colonies de bactéries ayant incorporé le plasmide (environ 7heures).

4-3-2-Protocole expérimental

Les plasmides contenant l'insert (0,1 à 0,5 µg) sont ajoutés aux bactéries compétentes décongelées, puis incubées sur la glace pendant 10 à 40 min. Un choc thermique est ensuite réalisé par chauffage à 42°C durant 2 min suivi d'une immersion dans la glace. Les bactéries transformées sont alors étalées sur une boîte de milieu gélosé (15 g d'agar pour 11 de milieu LB).

4-4-Mise en culture de bactéries transformées

Les bactéries qui forment des colonies blanches (couleur de bactéries résistantes à l'ampicilline, et ayant donc intégré un plasmide) sont ensemencées dans 1,5 ou 3 ml de LBA fraîchement préparé puis agitées 6 à 12h à 37°C.

4-5-Contrôle de l'insert

Les clones bactériens transformés avec la construction PGEX-5x-1 peuvent être de deux types selon l'orientation de l'insertion : le gène peut être orienté dans le bon sens et donc la traduction donnera la protéine de fusion, ou bien, le gène est inséré dans le mauvais sens et la traduction produira une protéine différente, ou pas de protéine du tout.

Cette discrimination est possible en réalisant des préparations des plasmides des clones bactériens résistants puis en découpant les plasmides avec des enzymes (Pst I pour la partie TM et Pst I et Pvu I pour la partie COOH). Dans le cas où l'orientation est bonne, des fragments d'ADN des tailles différentes de la mauvaise orientation seront observés. L'insertion du fragment d'intérêt dans le vecteur de bonne orientation est contrôlée par séquençage à l'aide des amorces spécifiques du vecteur.

4-5-1-Extraction de l'ADN plasmidique

4-5-1-1-Minipréparation d'ADN

Une colonie de bactérie est prélevée pour inoculer 2 mL de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection. La culture est incubée à 37°C pendant au moins 10 heures.

Les cellules sont alors centrifugées à 1400 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le culot bactérien est placé à -80°C pendant 30 minutes, mis en suspension dans 200µL de TE contenant de la RNase A et de la RNase T (10⁵ unités/mL) et incubé à 37°C pendant 10 minutes afin de laisser agir les enzymes .

La solution de lyse (NaOH 0.1% et sodium dodécylsulfate SDS 1%) est ajoutée aux cellules, le mélange est homogénéisé puis placé sur glace pendant 10 minutes. 200 µL d'une solution de neutralisation (acétate de potassium 3M) sont ajoutés.

Ce mélange est à nouveau incubé sur glace 10 minutes puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est prélevé et l'ADN plasmidique précipité pendant 1 heure à -80°C par l'ajout de 900µL d'éthanol absolu. L'ADN plasmidique est centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, l'éthanol est alors doucement retiré. Le culot d'ADN est lavé par l'ajout de 500µL d'éthanol 70%, centrifugé à nouveau à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Après élimination de l'éthanol, le culot d'ADN est séché à température ambiante, puis mis en suspension dans 50µL de TE.

4-5-1-2-Maxipréparation

Les bactéries transformées sont mises en culture dans 500mL de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection, pendant 12 à 20 heures à 37°C (en général une nuit). L'ADN plasmidique est ensuite extrait à l'aide du kit Qiagen conformément au protocole recommandé par le fournisseur. Les culots d'ADN sont repris dans 500µL de TE, la concentration d'ADN est estimée par mesure au spectrophotomètre (260 nm après une dilution au 1/250°).

4-5-2-Séquençage de l'ADN

Le séquençage est réalisé selon la méthode des didéoxynucléotides de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) sur un séquenceur automatique. Le séquençage se fait en deux étapes : la première consiste en la synthèse des fragments d'ADN simple brin (réalisée dans un appareil PCR classique), la seconde réside dans l'analyse de ces fragments par électrophorèse capillaire sur un analyseur ABI Prism. Un mélange de 500 ng de plasmide et 10 ng d'amorçes est dilué dans de l'eau qsp 7µL. L'ADN matriciel est dénaturé par un cycle de 2,5 minutes à ébullition / 2,5 min sur glace. Au mélange dénaturé sont ajoutés 3µL du réactif «Big Dye®» (Perkin Elmer) (contenant un mélange de déoxynucléotides / didéoxynucléotides fluorescents / polymérase), 3µL de tampon de réaction et de l'eau qsp 15µL. Le tube de réaction est alors soumis à une PCR de 25 cycles: dénaturation 96°C/6 sec, hybridation 50°C/5 sec et polymérisation 60°C/4 min. Les fragments d'ADN simple brin synthétisés sont précipités avec 80µL d'éthanol absolu ajouté au produit PCR. Après agitation au vortex, le mélange est placé sur glace pendant 20 minutes puis centrifugé 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Le culot est lavé par 150µL d'éthanol à 70% et centrifugé 5 minutes à 13 000 rpm. Le culot est alors séché à température ambiante et repris dans 15µL de formamide. L'ADN est dénaturé par

ébullition 2,5 minutes puis incubation sur glace 2,5 minutes. Pour l'analyse, la réaction dénaturée est transférée dans une plaque de 96 puits destinée à être placée dans l'appareil de séquençage.

4-5-3-Analyse informatique de l'ADN. L'alignement des séquences, la recherche des sites de coupures par les endonucléases de restriction, la recherche de cadres ouverts de lecture ainsi que la traduction en acides aminés des fragments d'ADN ont été effectués par les logiciels GeneJockey et DNA Strider. La comparaison avec les banques de données, GenBank, EMBL, Swiss-prot a été réalisée avec le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fonctionnant sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Les alignements multiples de séquences nucléiques et protéiques ont été effectués avec le programme CLUSTALW disponible sur le site www.infobiogen.fr/services/analyseq.

5- Expression et purification des protéines de fusion GST-PARL

5-1-Principe :

Quand les colonies spécifiques sont obtenues, les cultures de bactéries sont effectuées en présence de substance facilitant la production de ces protéines de fusion, les protéines peuvent être purifiées à partir de lysats bactériens par chromatographie d'affinité utilisant du glutathion. La GST a une très forte affinité pour le glutathion, ce qui va permettre la capture des protéines de fusion GST ; les impuretés seront supprimées par plusieurs lavages. Cette phase de purification permet d'obtenir de très grandes quantités de protéine de fusion.

5-2-Protocole expérimental

Une préculture de la souche prétransformée avec le vecteur d'expression d'intérêt estensemencée dans 2-3 mL de LB-ampicilline. Après 12 heures environ, la préculture est diluée au 1/1000ème dans du LB-ampicilline et poursuivie jusqu'à milieu de la phase exponentielle de croissance « DO 600 = 0,6-1,0 ». L'induction de l'expression de la protéine de fusion est commencée par ajout d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG, Roche) à 0.2 mM final. La croissance est poursuivie pendant quatre heures, puis la culture est transférée dans des flacons de 50 mL et centrifugée pour récupérer les culots bactériens.

Les culots bactériens sont lysés par 3 cycles de congélation-décongélation dans l'azote liquide. Ensuite ils sont soigneusement resuspendus dans un tampon de lyse puis laissés sur la glace pendant 10 min. La solution est ensuite centrifugée à vitesse maximum pendant 15 min pour faire culotter la fraction insoluble et séparer le surnageant contenant les protéines solubles et donc les protéines recombinantes.

La purification est effectuée sur une colonne de Glutathione SpharoseB® (Amersham) en respectant les recommandations du fabricant.

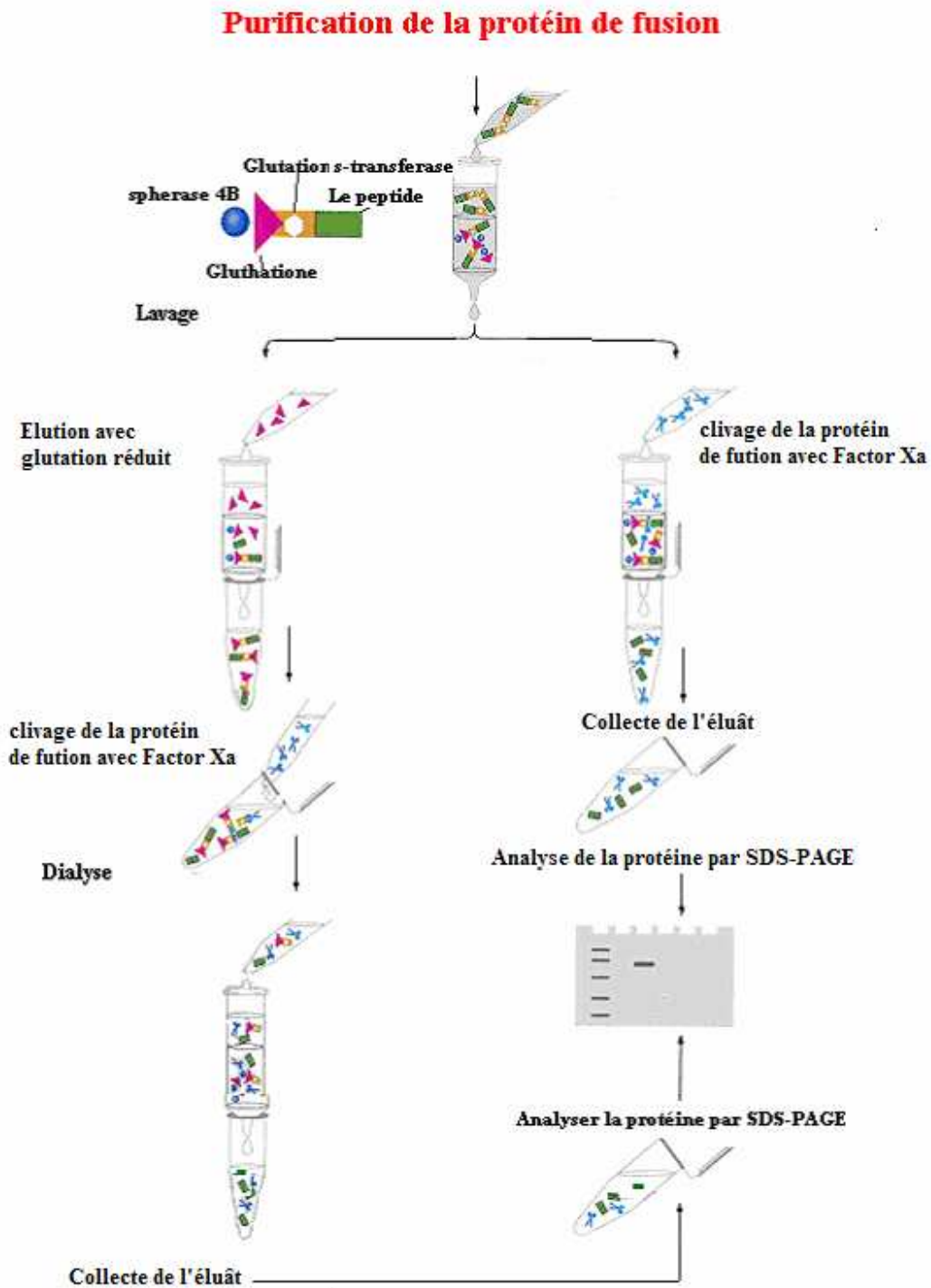


Figure N° 15 : Etapes de la purification de la protéine de fusion

6- Contrôle des peptides :

6-1-Contrôle quantitatif : Dosage des protéines, méthode de Bradford (1976). Après dialyse, les protéines sont dosées avec le réactif de Bradford ® (Sigma-Aldrich) afin d'estimer leur concentration. Une gamme étalon de BSA (Bovin Serum Albumin) variant de 0 à 8 µg/ml est réalisée avec le tampon de dialyse (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, DTT 1 mM), dans un volume final de 1 ml. Les échantillons protéiques sont également dilués dans le tampon de dialyse avant d'ajouter le réactif de Bradford et de lire l'absorbance à 595 nm. La concentration protéique de chaque essai est estimée par rapport à la droite étalon obtenue avec la gamme BSA, après élimination de la valeur de l'absorbance du témoin blanc ne contenant que du tampon de dialyse et du réactif de Bradford.

6-2-Contrôle qualitatif : La réactivité des peptides

L'immunogénicité de chaque peptide est contrôlée par SDS-PAGE, par le western blot et par la production d'anticorps après l'immunisation d'un lapin par un peptide. Pour ce faire, deux lapins sont immunisés après injections sous-cutanées de 1 mg de peptide dans l'adjuvant de Freund, soit 1 lapin pour chaque peptide selon un protocole classique. La production d'anticorps sera évaluée dans le sérum chaque semaine par immunoblot.

ELISA anti BP180

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) : Les anticorps anti BP 180 ont été recherchés dans le sérum de patient par une technique ELISA en sandwich.

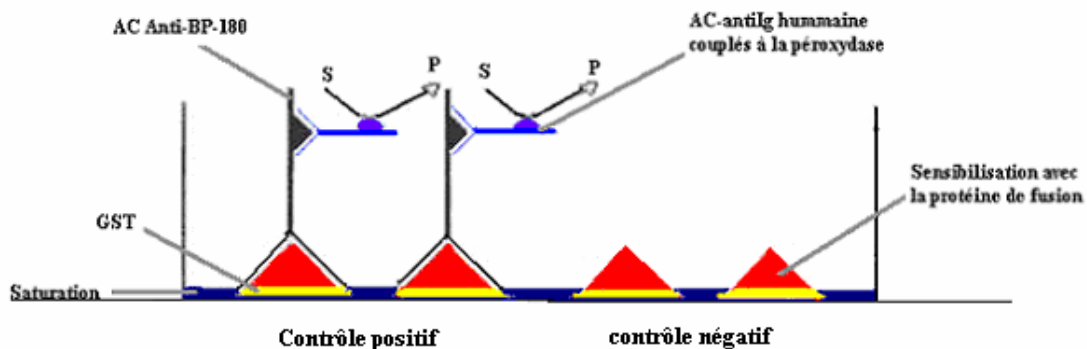


Figure N° 16 : Technique ELISA.

Protocole du test ELISA

Cent microlitres de protéines de fusion à 20 ng/ μ l sont déposés dans les puits de plaques de microtitrations à fond plat (GST 96 –well détection Module, Amercham). Chaque sérum est testé en double : deux puits sont coatés avec la protéine de fusion et deux puits sont coatés avec uniquement la protéine GST du vecteur sans insert permettant ainsi d'évaluer une éventuelle fixation non spécifique des sérums sur les plaques, et un témoin négatif est aussi effectué avec les sérums.

Après lavages avec tampon PBS - 0,1% de Tween20 en Automate (laveur labsysteme), tous les puits sont saturés avec 200 μ l de solution de PBS contenant 1% de BSA à 37 °C pendant une heure. Après une série de lavage, 100 μ l de sérums dilués au 1/100 en tampon PBS - 0,1% de Tween20 sont déposés dans chaque puits et incubés pendant une heure à 37°C.

Après une deuxième série de lavage en PBS additionné de 0.1% de Tween20, chaque puits est incubé avec un anticorps anti immunoglobuline humaine d'isotype IgG couplé à la peroxydase dilué au 1/1000 dans PBS- de Tween20 Anti IgG humain® (Bio-RAD)

Après une heure d'incubation à température ambiante, une deuxième série de lavages est effectuée. La réaction est révélée par l'addition de 100 μ l d'Ortho-Phénylène-Diamine (OPD) (SIGMA), substrat enzymatique préparé extemporanément (8 ml d'eau distillée + 1 ml de tampon citrate 10X + 1 ml d'OPD + 10 μ l d'H₂O₂). La coloration se développe à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée après 5-6 min par 30 μ l d'acide sulfurique 8 N. La densité optique est lue sur un lecteur Elisa à 492 nm de longueur d'onde.

B - Identification d'anticorps sérique anti peau par western blot

Principe :

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse en SDS-PAGE en gel d'acrylamide 5-12% (selon le poids moléculaire du peptide ou de la protéine). La migration est contrôlée par la présence de poids moléculaire standard (Biorad) pendant 1h 30 sous un courant constant de 20 mA.

Après la migration électrophorétique, les protéines sont transférées de façon active sur une membrane Hybond-P (fluorure de polyvinylidène PVDF, Amersham-pharmacia, Biotech) dans un appareil de transfert semi-sec, et le tampon utilisé est du (Tris 50mM, glycine 380 mM, SDS 0,1%, méthanol 20%) pendant une heure sous un courant de 200 mA.

Le transfert est contrôlé par la coloration au rouge ponceau de la nitrocellulose et par coloration du gel d'acrylamide au bleu de Coomassie. La membrane de nitrocellulose est saturée en PBS -lait écrémé 5% pendant deux heures à température ambiante à une nuit à +4°C

Après 10 min de lavage en PBS, la feuille de nitrocellulose est incubée avec l'Ac correspondant au peptide étudié, dilué en PBS au 1/1000^e, pendant 2 heures à température ambiante. La membrane est lavée 5 fois pendant 10 min en PBS-Tween 20, puis incubée avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (ou à la peroxydase) (Immunotech) pendant 1 heure à température ambiante.

Après 5 lavages en PBS-Tween, la phosphatase alcaline est révélée par le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma) dilué en tampon Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M et MgCl₂ 0,05 M en présence de diméthyl formamide. Au bout de 30 min d'incubation la réaction est arrêtée par lavage en eau bidistillée.

Western blot pour les protéines épidermiques

On transfère sur une membrane de nitrocellulose les protéines extraites de peau puis on découpe des bandelettes que l'on fait réagir avec le sérum des patients.

Préparation de l'extrait épidermique : (Bernard *et al.*, 1990)

Les échantillons de peau humaine normale provenaient de la chirurgie plastique (dermolipectomie, mammoplastie). La séparation dermo-épidermique est obtenue par la chaleur selon la méthode de Peterson (1984), à 56°C pendant 30 sec. Les protéines épidermiques sont extraites dans le tampon d'extraction suivant : 65 mM de Tris HCL (Ph 6,8) contenant 2% de sodium dodécylsulfate (SDS), 10 mM d'éthylène diamine tétra-acétate

(EDTA), 2 mM de phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF) et 0,01 mg / ml d'inhibiteurs de protéases : pepstatin, antipain, chymostatin, et leucopeptin (Sigma Chemical Co). L'ensemble est ensuite ultrasoniqué puis centrifugé (10 000 à 20 000 g), pendant 20 min. Le surnageant, est recueilli, aliquoté et congelé à -30°C ou -70°C.

Le SDS PAGE est réalisé selon la méthode de Laemmli en gel acrylamide 5 %.

Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose, comme décrit par Towbin en 1979 dans le tampon suivant : Tris 25mM, glycine 192mM, méthanol 20%. (Le transfert s'effectue pendant 18 heures, à 30 volts.)

Réaction immunologique (Bernard *et al.*, 1990) :

Après la saturation de la membrane 2 heures à température ambiante, les bandes de nitrocellulose sont découpées, puis incubées 2 heures à température ambiante, dans le tampon Tris/NaCl/BSA/TWEEN 20 (TTBS), avec les sérums à étudier. Ces sérums sont utilisés à la dilution 1/100°.

Après 5 lavages dans le TTBS, une deuxième incubation avec les anticorps monoclonaux anti-sous-classes d'IgG est réalisée pendant une heure à température ambiante. Après cinq lavages dans du TTBS, chaque bande est incubée pendant une heure à température ambiante avec un anticorps anti-Ig de souris, couplé à la peroxydase, dilué au 1/400°.

La révélation s'effectue après cinq lavages en TTBS, suivis de trois lavages en Tris, avec le 3-3-diaminobenzidine (DAB) à 0,5mg/ml dans du Tris HCL à 100 mM (PH 7,4) contenant 0,01% d' H₂O₂ ajoutée extemporanément .

Analyse de l'expression des molécules HLA sur les cellules conjonctivales

L'analyse de l'expression de surface des molécules HLA a été effectuée sur une lignée conjonctivale et sur des cellules conjonctivales de patients et de témoins recueillis par immunoempreinte.

Lignées cellulaires

L'expression de surface des molécules HLA a été étudiée sur une lignée conjonctivale Clone 1-5C-4, obtenue auprès de l'ATCC (référence CCL-20.2) et comparée à l'expression des molécules HLA sur la lignée LY-91, lignée dérivée d'un lymphome de Burkitt (obtenue auprès de M. Cogné, UMR CNRS 6101). La lignée conjonctivale 1-5C-4, initialement considérée comme dérivant de la conjonctive normale, semble dérivé de la lignée Hela.

Conditions de culture des lignées

Les cellules LY-91 sont cultivées dans du milieu complet : RPMI 1640 (Gibco) additionné de 2 mM de L-glutamine, et sérum de veau fœtal 10% (SVF) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min, 100µg/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C sous 5% de CO₂ et sous atmosphère humide.

Les cellules 1-5C-4 sont incubées en milieu 199 avec BSS de Hank (Sigma) additionné 0,68 mM glutamine, 0,35 g/l sodium bicarbonate et 10% de sérum de veau fœtal à 37°C sous 5% de CO₂. Pour les amplifier, elles sont lavées deux fois avec du PBS 1x, détachées de leur support par l'action de Trypsine pendant environ 5 minutes à température ambiante. L'action de la Trypsine est arrêtée par du milieu complet, les cellules ainsi détachées sont centrifugées à 1200 rpm pendant 8 minutes. Elles sont ensuite mises en suspension dans du milieu complet, pour être réparties sur des boîtes de culture.

La viabilité cellulaire est alors contrôlée par un test d'exclusion au bleu trypan. Le colorant à 0,25 % (p/v dans l'eau distillée) est ajouté à un aliquote de la suspension cellulaire. Le nombre de cellules mortes (colorées en bleu) par un ml de milieu est déterminé par comptage sur une lame de Malassez. Un volume de la suspension cellulaire lavée est transféré dans du milieu de culture neuf, préchauffé à 37°C, afin d'ensemencer chaque lignée à $2,5 \times 10^5$ cellules par ml de milieu.

Les lignées à une concentration ajustée de un $\cong 10^5$ cellules par ml, ont été cultivées en absence et en présence de différentes concentrations d'IFN γ (R&D) avec ou sans TNF α (R&D) et TGF β 1 (R&D). Après 24, 48 et 72 heures d'incubation avec la (ou les) cytokine(s) correspondante(s) l'expression de surface des molécules HLA de classe I et II a été analysée en cytométrie de flux. Pour l'analyse en cytométrie de flux, les cellules prélevées sont lavées

deux fois (200 g, 5 minutes à 4°C) dans du PBS filtré et mises en suspension dans 500 µl de PBS-1% paraformaldéhyde.

Réalisation des Immuno-empreintes (Pisella *et al.*,2000)

Deux morceaux de membrane de nitrocellulose (filtre de polythersulfone®, 0,2 µm d'épaisseur et 13 mm de diamètre, Gelman sciences) sont appliqués sur la cornée au niveau du bulbe conjonctival (région conjonctivale) par l'ophtalmologiste. Immédiatement après le contact, la membrane est plongée dans un tube stérile contenant 1,5ml de PBS froid (tube Falcon de 15 ml). Les tubes sont conservés à +4°C jusqu'à l'isolement des cellules qui est effectué dans les 24 heures après le prélèvement. Pour récupérer les cellules conjonctivales, on ajoute directement dans le tube qui contient la membrane, 4 ml de PBS albumine 1%.

Le tube est mis sous agitation douce pendant 30 min puis centrifugé à 400 g pendant 5 min. Sur le culot cellulaire sont ajoutés 500 µl de RPMI ; la suspension cellulaire est comptée sur une lame de Malassez. Seuls les échantillons contenant plus de 3000 cellules sont conservés pour l'analyse par cytométrie en flux.

Marquage direct des molécules HLA : 100 µl de cellules sont incubés en présence de 20 µl d'un anticorps anti HLA ou d'un contrôle isotypique couplé à la fluorescéine FITC pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de lumière (Tableau N° 4). Après deux lavages en PBS, les cellules sont reprises dans 300µl PBS-PFA 1 % et conservées à l'obscurité jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux.

Epitope	Clone	Isotype
Control iso-type I	MOPC-21	IgG,1κ de souris
AC anti HLA-ABC Humain	G46-2,6	IgG,1κ de souris
Control iso-type II	G155-178	IgG2α,κ de souris
AC anti HLA-DR Humain	G46,6(L243)	IgG2α,κ de souris
AC anti HLA-DQ Humain	TÜ169	IgG2α,κ de souris
AC anti cytokératine	CAM5,2	IgG, 2α, de souris

Tableau N° 4 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.

Analyse en cytométrie de flux

L'analyse en cytométrie de flux a été réalisée à l'aide d'un analyseur XL (Coulter) équipé de laser Argon de 15mW émettant une lumière d'excitation à 488nm. Le filtre bande-passe pour la fluorescéine était de 530nm. La fluorescence verte était analysée en mode logarithmique sur des cellules fenêtrées sur un cytogramme biparamétrique associant taille et structure. L'analyse portait sur 5000 cellules pour les lignées cellulaires et au moins 1000 cellules pour les cellules conjonctivales obtenues par immuno-empreinte.

Analyse immunogénétique :

L'analyse des typages HLA a été effectuée par le laboratoire HLA, CHU de Limoges dans le cadre du bilan d'exploration immunologique des pemphigoïdes bulleuses.

Extraction d'ADN génomique eucaryote

L'ADN a été extrait par la méthode saline (*Miller et al., 1988*) à partir de 500 µl de sang total ou de biopsies cutanées. Après addition de 1 ml de tampon de lyse (Sucrose 0,3M, Tris HCl 10mM pH 7,5, MgCl₂ 10%, Triton 100X), les échantillons sont agités puis centrifugés pendant 2 minutes à 13000g. Le culot cellulaire est lavé 2 fois en eau bi distillée, puis suspendu dans 360 µl de tampon d'extraction contenant de la protéinase K et incubé pendant 30 mn à 56°C. 100 µl de NaCl 6M sont ajoutés. Après une agitation vigoureuse, le tube est centrifugé pendant 5 mn à 13000 g. Le surnageant est transféré dans un tube propre. L'ADN est précipité par addition d'1 ml d'éthanol à 99%. Le culot d'ADN, récupéré par centrifugation, est dissout dans 50 à 200µl de tampon TE (Tris-HCl 10mM PH 8,0, EDTA 1mM).

Typage HLA générique et allélique :

Les typages DRB1 et DQB1 génériques ou alléliques par la technique de PCR-SSP (polymérase chaîne réaction séquence spécifique primer), décrite par Olerup (*Olerup et al., 1993*), à l'aide de Kit du commerce et en respectant les conditions recommandées par les fabricant. Les allèles ont été assignés en respectant la nomenclature internationale WHO de 2000 (*Olerup et al., 1993 ; Bodmer et al., 1997*).

5- Analyse statistique

L'analyse informatique a été effectuée à l'aide du logiciel Statview. La distribution de fréquence entre des échantillons a été effectuée par le test de Chi² ; p est significatif si $\chi^2 \geq$

3,74. Les comparaisons des expressions de surface ont été effectuées par le calcul des écarts moyens (test t), avec des séries appariées.

Annexes tampons

Milieus de culture pour bactéries :

Milieu minimum (MM) : MgSO₄ 1mM, thiamine HCL 1mM, CaCl₂ 0,1mM, glucose 1,1mM, agar 15g/l dans une solution de sels M9 (Na₂HPO₄ 0,6%, NH₄Cl 0,1%, KH₂PO₄ 0,3%, NaCl 0,05%).

Milieu LB : NaCl 1%, Bactotryptone 1%, Extrait autolytique de levure 0,5%, pH ajusté à 7,4 avec NaOH 10 N.

LBA : Milieu LB + Ampicilline (50µg/ml).

TSS 1X : (milieu LB sans antibiotique, PEG 10%, DMSO 5%, MgSO₄ 20-50 mM, pH final 6,5).

Solutions stock :

TE : Tris-HCl 10mM PH 8,0, EDTA 1mM.

STET : sucrose 8%, tritonX 5%, Na₂EDTA 50mM, Tris 50mM pH 8,0.

X-Gal 10% : 1g de X-Gal dans 10ml de diméthylformamide.

IPTG 10% : 1g d' IPTG dans 10ml d'eau.

Solutions stocks pour sds-page :

Ammonium Persulfate 10% : 1 g de dans 10 ml d'eau

Tris Hcl 1M, pH 8,8 : 24,23 g de Tris dans 200 ml d'eau .

Tris Hcl 1M ,pH 6,8 : 28,24 g de Tris HCL ou 3,88 g de Tris base dans 200 ml d'eau

Acrylamide Stock 45% : 18g de Acrylamide, 0,48 g de NN' Bisacrylamide dans 40 ml d'eau

SDS 10%

Tampons pour électrophorèse :

TBE 1X : Tris 50mM, acide borique 50mM, EDTA 1,25mM.

TAE 1X : Tris 40mM, acétate de sodium 20mM, EDTA- Na_2 1mM ; ajusté à pH 7,2 avec de l'acide acétique.

Tampon de charge pour l'ADN : bleu de bromophénol 2,5%, xylène cyanol 0,25% dans du glycérol (40% initial). Ou Rouge de Crésol à 2.2 mg/ml, glycérol 40%.

Tampon TE : TrisHCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.

Tampon pour ELISA :

PBS 1X : tampon phosphate 0,01 M pH 7,4, Na Cl 0,15M

Tampon de lavage PBS-TWEEN à 0,1% : ajouter 1 ml de Tween dans 11 de tampon PBS.

Tampon de saturation et de dilution: PBS-TWEEN 0,1%.

Tampon CITRATE 10 X : Pour la préparation de 100 ml de la solution 10X PH 6 : 10,14g de NaH_2PO_4 + 3,57g de Acide Citrique.

OPD 10 X, Ortho-Phénylène-Diamine (de SIGMA), pour 100 ml : 1,08 g d'OPD +10 ml de tampon citrate 10X.

Résultats :

Anti BP 180 et HLA

1- Validation des peptides de synthèse :

- Les peptides NH₂ (de 488 à 585 aa) et COOH (de 1399 à 1530 aa) obtenus (tableau N3) ont été validés après la purification par :
- SDS-PAGE en gel d'acrylamide qui montre la présence des bandes d'intérêt pour les 2 peptides de \approx 45 k D.
- Western blot, en effectuant une révélation à l'aide de l'anti corps Anti GST-HRP (Amersham) (figure N° 19) : après la purification, seule une bande de taille correspondant à la taille espérée est présente.
- Immunisation des lapins : un lapin a été immunisé par chaque peptide.

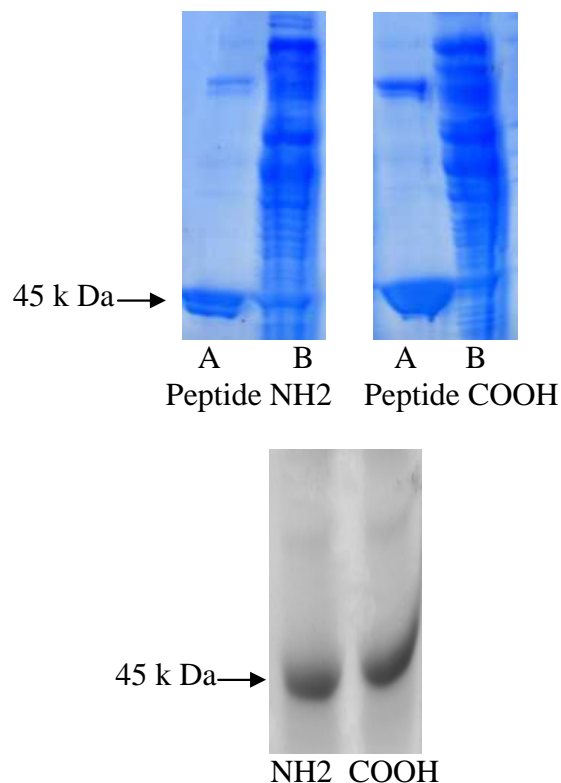


Figure N° 17 : Contrôle de synthèse des peptides : SDS page des peptides NH₂ et COOH après la purification (colonne A) et avant la purification (colonne B), et Western blot après la purification.

2- Comparaisons de la détection des anticorps anti BP 180 par la technique de ELISA et la technique de Western blot sur les sérums de patients :

Détermination du seuil de positivité des tests ELISA :

- Pour établir le seuil de positivité, nous avons effectué l'analyse des sérums de 60 donneurs sains, indemnes de pathologie dermatologique. La recherche d'anticorps sérique anti peptide COOH ou NH₂ a été considérée positive si la différence de densité optique du test et du témoin négatif de GST, était supérieure de 2 fois les écarts types avec un intervalle de confiance de 95%. La moyenne des DO était $0,124 \pm 0,071$ pour le peptide NH₂ et $0,052 \pm 0,037$ pour le peptide COOH.

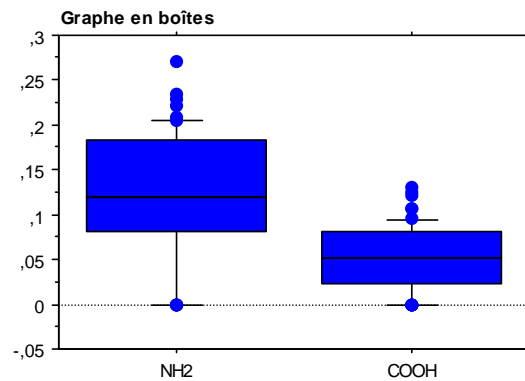


Figure N° 18 : Calcul du seuil de sensibilité : Densité optique moyenne obtenue par technique ELISA avec les peptides NH₂ et COOH par analyse des sérums de 60 témoins sains.

Analyse des sérums de patients

121 sérums de la sérothèque du service de dermatologie, prélevés chez des patients présentant une dermatose bulleuse, conservés à -20°C , et préalablement analysés par technique de western blot, ont été analysés par notre technique ELISA avec les deux peptides de synthèse. Cinq sérums (4,1%) sont considérés ininterprétables car la densité optique mesurée sur le test ELISA-GST sans peptide (témoin GST) était trop élevée (> 2 fois la DO du témoin négatif) ; témoignant d'un bruit de fond élevé.

Un anticorps anti BP180 dirigé contre la partie transmembranaire a été trouvé sur 82 sérums (67,8 % des sérums analysés), avec une DO moyenne de $1,141 \pm 0,916$. Le test ELISA spécifique de la partie COOH de BP180 était positif sur 24 sérums (19,8%), avec une DO moyenne de $0,278 \pm 0,194$. Vingt et un sérums présentaient une positivité pour les deux épitopes (17,35% des sérums analysés).

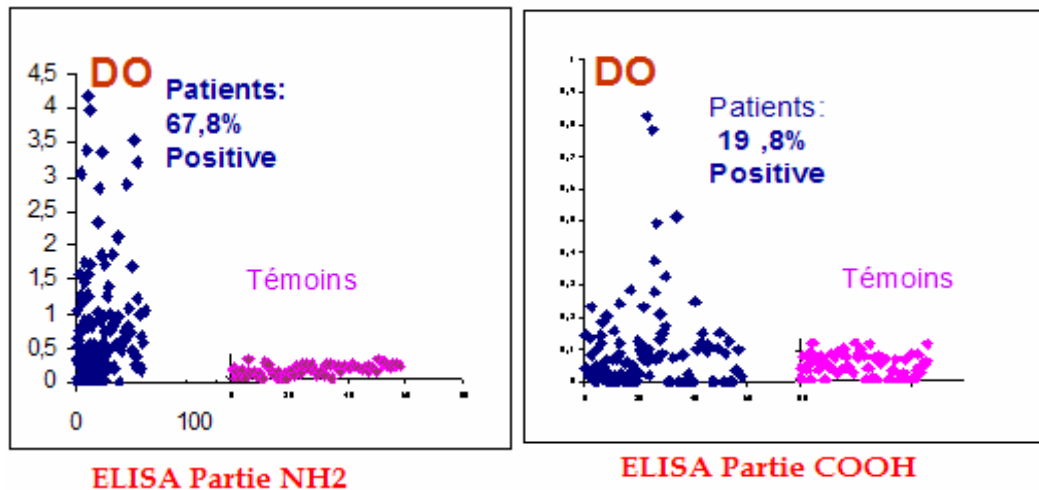


Figure N° 19 : ELISA des peptides NH2 et COOH de la PB180

La comparaison de la technique western blot et ELISA montre une corrélation de 59,5 % (72/121 sérums) : 49 sérums étaient positifs par techniques de western blot et pour au moins un des 2 tests ELISA ; 23 sérums étaient négatifs pour le western blot et les 2 tests ELISA. Dans 6,6 % des cas (8/121) le test de western blot permet de mettre en évidence un anti BP180, non détecté par les 2 tests ELISA que nous avons développés. Dans 33,9% des cas (41/121 sérums) un des tests ELISA s'est avéré positif alors que le WB est négatif.

ELISA \ WESTERN BLOT	Nombre (%) de sérums négatifs NH2 et COOH	Nombre (%) de sérums COOH positifs et NH2 négatif	Nombre (%) de sérums NH2 positifs et COOH négatifs	Nombre (%) de sérums positif NH2 et COOH
BP180 positif (N= 57 ; 47,1%)	8 (6,6%)	1 (0,8%)	34 (28%)	14 (11,5%)
BP 180 négatif (N= 64 ; 52,9%)	23 (19,0%)	4 (3,3%)	30 (24,8%)	7 (5,8%)
Total (N= 121; 100%)	32 (26,4%)	5 (4,1%)	64 (52,9%)	21(17,3%)

Tableau N°5 : Comparaison des résultats obtenus pour la recherche d'anticorps anti BP180 par technique ELISA/ Western blot.

3- Distribution de la fréquence des allèles HLA dans les pemphigoïdes bulleuses dans la région Limousin

Le typage HLA a été effectué chez cent cinquante quatre patients atteints de pemphigoïdes bulleuses depuis 1998 ; cette base de données permet de valider les données des études antérieures publiées par le laboratoire et a servi de base à notre étude sur la relation HLA et réponse humorale.

En résumé, l'analyse comparative de la distribution des allèles HLA dans le groupe malade et un groupe de sujets sains (106 sujets) montre dans le groupe malade :

- Une augmentation de la fréquence des allèles HLA-DQB1*0301 (pemphigoïdes: 33,8 % ; témoins : 22,2 % ; χ^2 corrigé 34,8 ; $p < 0,001$) ; DRB1*1101/04 (pemphigoïdes: 17,6% ; témoins : 7,5 % ; χ^2 corrigé : 5,77 ; p corrigé = 0,02)
- Une diminution de la fréquence des allèles DRB1*0301 ((pemphigoïdes: 4,9% ; témoins : 12,7 % ; $\chi^2 = 11,47$; p corrigé = 0,0013) ; DQA1*0201 (pemphigoïdes: 8,8% ; témoins : 17,9 % ; $p = 0,003$) ; DQB1*0201 (pemphigoïdes: 5,5% ; témoins : 11,8 % χ^2 6,6 ; $p = 0,01$). Il est à noter que ces 3 allèles sont en déséquilibre de liaison, et forment l'haplotype HLA-DRB1*0301 DQA1*0201 DQB1*0201.

Dans le groupe malade, la distribution des allèles HLA diffère pour les PB (83 patients) et PC (40 patients).

- La fréquence des allèles DQB1*0301 est significativement augmentée dans la PC (PC : 48,8% ; PB: 27,7 % ; χ^2 10,3 ; $p = 0,0013$). L'augmentation de fréquence de l'allèle DRB1*1101/04 dans le groupe des PC (25,0%), par rapport au groupe PB (13,9%) (χ^2 corrigé = 4,64) peut être expliqué par le déséquilibre de liaison entre ces deux allèles dans la population caucasienne.
- Par contre, la fréquence de l'allèle DRB1*1301 est plus importante chez les patients atteints de PB (10,2%) que chez les patients atteints de PC (6,3%), de même que la fréquence de l'allèle DQB1*0302 (PB : 11,4% ; PC : 3.8% ; χ^2 3,92 ; NS).

Ces différences entre PB et PC nous ont conduit à nous interroger sur la relation entre la réponse humorale vis-à-vis des deux épitopes (PB180-NH2 , PB180-COOH) et les génotypes HLA des patients dans les deux maladies.

4- Réponses anti BP 180 et phénotype HLA :

A partir de la base de données du laboratoire HLA, nous avons analysé la distribution des allèles HLA de classe II en fonction de la réponse humorale pour 46 patients pour lesquels nous disposions de sérums prélevés avant traitement (sérums pour diagnostic) et du typage HLA de classe II. Ces résultats sont résumés dans les tableaux N° 6-7-8.

Dans ce contingent de patients, 31 patients présentaient un test ELISA positif pour l'épitope anti BP180- NH2 et 7 patients pour le test ELISA anti BP180-COOH. 32 patients avaient au moins un des 2 tests ELISA positif.

Nous avons observé, pour les malades présentant une positivité de l'ELISA anti BP180-NH2, une augmentation de la fréquence des allèles HLA-DQB1*0301, *0302, *0501 et par rapport au groupe de malades dont le test ELISA anti BP180-NH2 était négatifs :

- **HLA-DQB1*0301** (18 patients) : un anti BP-180-NH2 est détecté chez 72,2 % (13 cas)

- **HLA-DQB1*0302** (10 patients) : un anti BP180-NH2 a été détecté dans tous les patients (100% patients) porteurs de cet allèle. Seule cette association est statistiquement significative ($p = 0.04$).

- **HLA-DQB1*0501** : (13 patients): un anti BP-180-NH2 est détecté chez 69,2 % (8 cas)

Il est à noter qu'au total, 72,4% des malades présentant l'un de ces 3 allèles ont développé une réponse anti BP180-NH2 contre 58,8 % chez les malades ne présentant pas un de ces allèles. Cette différence est non significative avec cet effectif.

Concernant les anti BP180-COOH : aucune corrélation entre génotypage HLA et réponse anticorps n'a été mise en évidence.

DRB1*	Total Nombre	Epitope NH2		Epitope COOH		Epitope NH2 ou COOH	
		Négatif Nombre	Positif Nombre	Négatif Nombre	Positif Nombre	Négatif Nombre	Positif Nombre
DRB1*0101/ 102/103	14	4	10	13	1	4	10
DRB1*0301	2	1	1	2	0	1	1
DRB1*0401	5	3	2	3	2	2	3
DRB1*0402	2	0	2	2	0	0	2
DRB1*0403	5	0	5	4	1	0	5
DRB1*0404	2	0	2	2	0	0	2
DRB1*0405	1	0	1	0	1	0	1
DRB1*04XX	2	2	0	2	0	2	0
DRB1*0701	7	3	4	5	2	3	4
DRB1*08XX	3	1	2	3	0	1	2
DRB1*1101	16	5	11	13	3	5	11
DRB1*1103	2	1	1	2	0	1	1
DRB1*1104	4	2	2	4	0	2	2
DRB1*12XX	1	0	1	0	1	0	1
DRB1*1301	5	0	5	5	0	0	5
DRB1*1302	8	4	4	7	1	3	5
DRB1*1303	4	1	3	3	1	1	3
DRB1*13XX	1	0	1	1	0	0	1
DRB1*14XX	2	1	1	2	0	1	1
DRB1*1501/ 02/XX	5	1	4	4	1	1	4
DRB1*16XX	1	1	0	1	0	1	0
Total	92	30	62	78	14	28	64

Tableau N° 6 : Distribution du nombre de patients exprimant les allèles HLA-DRB1 en fonction de la présence d'anticorps anti PB180-NH2 ou (et) COOH détectés par ELISA.

Abréviation : NS =non significatif

Patients exprimant l'allèle	Total	NH2		COOH		ELISA		Signification P = $\chi^2 =$
		Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
DQB1*0201	2	1	1	2	0	1	1	
DQB1*0202	6	2	4	4	2	2	4	
DQB1*0301	38	14	24	31	7	13	25	
DQB1*0302	10	0	10	8	2	0	10	P=0.04 ; $\chi^2 =5,49$
DQB1*0303	1	1	0	1	0	1	0	
DQB1*0402	3	1	2	3	0	1	2	
DQB1*0501	13	5	8	12	1	4	9	
DQB1*0503	2	0	2	2	0	0	1	
DQB1*0602	5	1	4	4	1	1	4	
DQB1*0603	5	0	5	5	0	0	5	
DQB1*0604	4	2	2	4	0	2	2	
DQB1*0609	3	1	2	2	1	0	3	
Total	92	30	62	78	14	28	64	92

Tableau N°7 : Distribution du nombre de patients exprimant les allèles HLA DQB1 en fonction de la présence d'anticorps anti PB180-NH2 ou (et) COOH détectés par ELISA.

Patients exprimant l'allèle	Total Nombre	NH2		COOH		ELISA	
		Négatif Nombre	Positif Nombre	Négatif Nombre	Positif Nombre	Négatif Nombre	Positif Nombre
DQA1*0101	13	4	9	12	1	4	9
DQA1*0102	16	5	10	14	2	5	11
DQA1*0103	3	0	3	3	0	0	3
DQA1*0104	2	1	1	2	0	1	1
DQA1*0201	7	3	4	5	2	3	4
DQA1*0301	13	2	11	10	3	2	11
DQA1*0303	4	2	2	3	1	2	2
DQA1*0401	3	1	2	3	0	1	2
DQA1*0501	25	9	16	21	4	9	16
DQA1*0505	6	1	5	5	1	1	5
Total	92	30	62	78	14	28	64

Tableau N° 8 : Distribution du nombre de patients exprimant les allèles HLA DQA1 en fonction de la présence d'anticorps anti PB180-NH2 ou (et) COOH détectés par ELISA.

II-Expression des molécules HLA sur les cellules conjonctivales

1- Les lignées :

1.1. Effet de chaque cytokine :

Nous avons étudié l'effet de l'IFN γ et du TNF α sur l'expression des molécules HLA de classes I et II sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée lymphoïde LY-91, qui nous a servi de contrôle. Cette étude a été effectuée en présence de dose de cytokines comprises entre 1 ng/ml et 500 ng/ml après 24H, 48 heures et 72 heures de cultures. Les modifications observées à 48 et 72 heures ne sont pas significativement différentes. Les résultats sont les moyennes obtenues sur 3 expérimentations.

Pour les molécules HLA-ABC : La lignée conjonctivale 1-5C-4 exprime plus fortement les molécules HLA de classe I à l'état basal que la lignée LY-91. L'IFN γ génère une augmentation environ 2 fois plus importante de l'expression des molécules HLA-ABC que le TNF α , quelle que soit la dose pour la lignée conjonctivale. Ces résultats sont différents de ceux observés sur la lignée lymphoïde LY-91 pour laquelle IFN γ et TNF α entraînent une augmentation modérée et équivalente d'expression des molécules HLA-ABC.

Pour les molécules DR : La lignée conjonctivale 1-5C-4 n'exprime pas à l'état basal les molécules HLA-DR, contrairement à la lignée LY-91. Aucune dose de TNF α n'a permis d'observer une induction d'expression des molécules HLA-DR sur cette lignée. Par contre, l'IFN γ , à des concentrations supérieures à 5 ng/ml, induit faiblement l'expression des molécules HLA-DR.

Pour les molécules DQ : Nous avons observé une absence d'expression des molécules HLA-DQ tant à l'état basal, qu'après stimulation par l'IFN γ et/ou le TNF α sur la lignée conjonctivale.

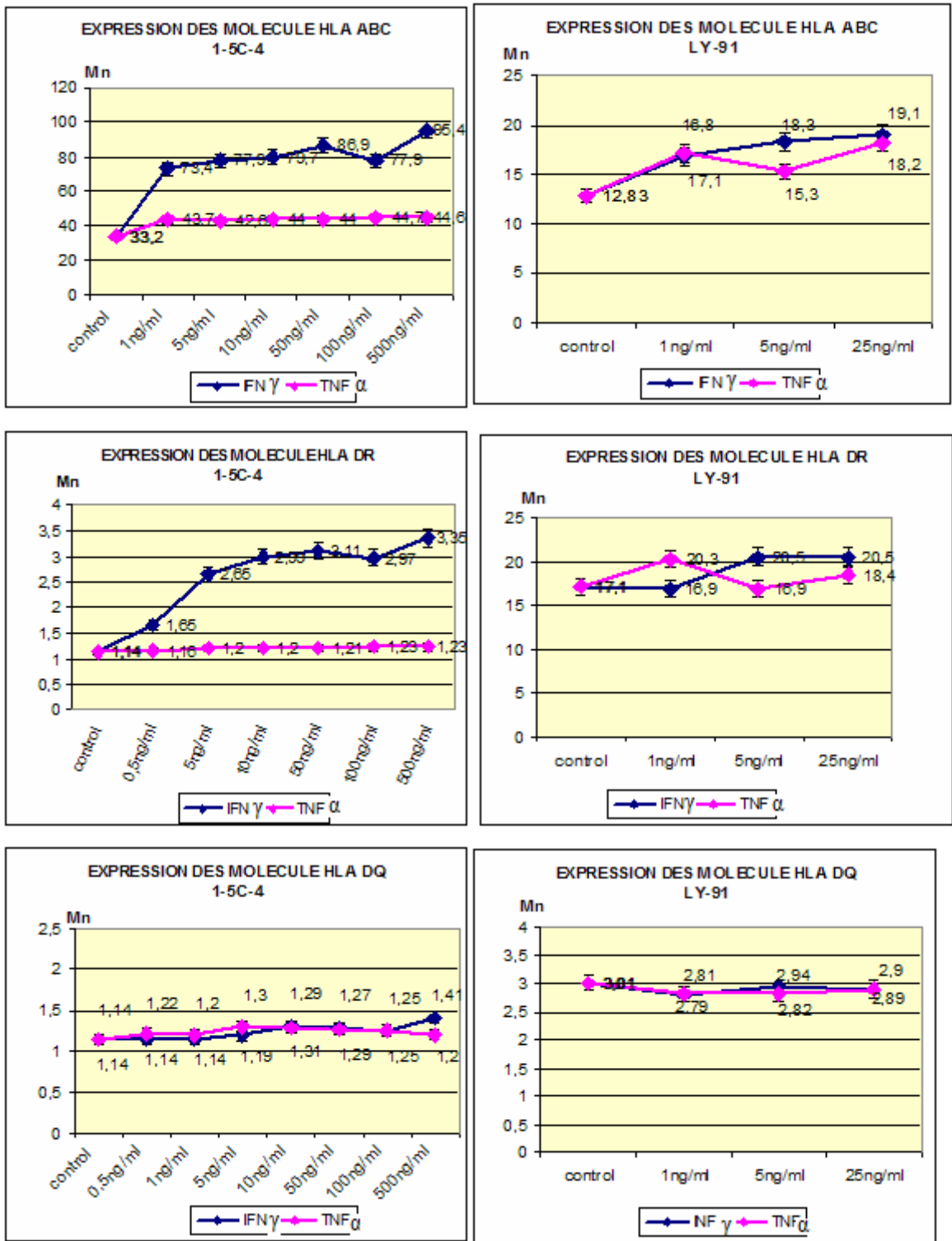


Figure N° 20 : Comparaison de l'effet des cytokines de l'IFNγ et TNFα sur l'expression cellulaire des molécules HLA-ABC sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée LY-91 après 48 heures de cultures. La valeur de l'axe des ordonnées correspond à une moyenne de fluorescence mesurée par cytométrie sur 3 expérimentations.

2.2. Effet combine de l'IFN γ et le TNF α

Au terme de la précédente analyse nous avons étudié l'effet combiné des 2 cytokines, IFN γ et TNF α à des doses de 10 ng/ml sur l'expression des molécules HLA sur les cultures cellulaires.

2.2.1 Sur l'expression cellulaire des molécules HLA-ABC :

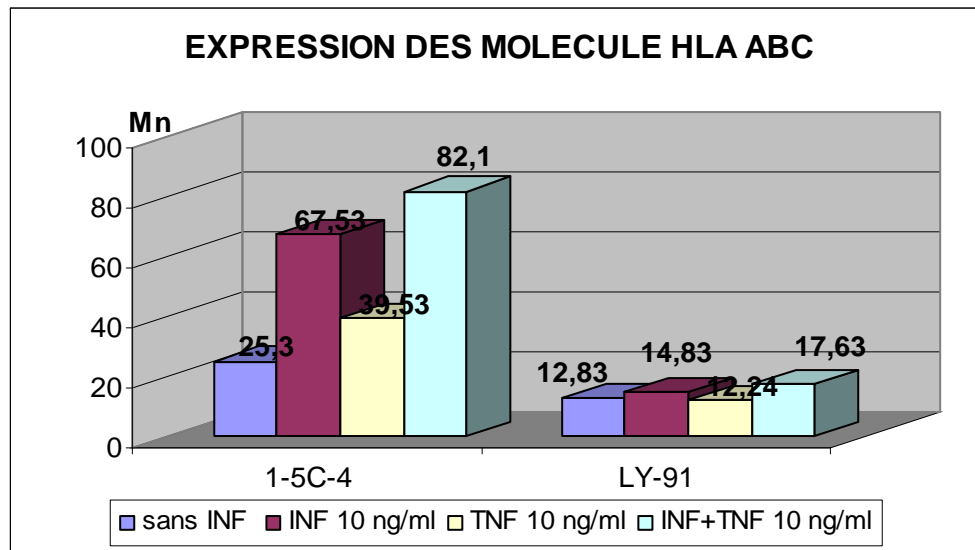


Figure N° 21 : Comparaison de l'effet combiné de l'IFN γ et du TNF α sur l'expression cellulaire des molécules HLA-ABC sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée LY-91.

L'association de l'IFN γ et du TNF augmente plus l'expression membranaire des molécules HLA-ABC sur la lignée conjonctivale 1-5C-4, que chaque cytokine isolée. La moyenne de l'intensité de fluorescence des molécules HLA-ABC est de $25,3 \pm 1,5$ à l'état basal, $82,1 \pm 11,1$ après 48 heures de culture en présence d'IFN γ et de TNF α ($p = 0,009$), $67,5 \pm 13,2$ en présence d'IFN γ seule ($p = 0,02$), et de $39,5 \pm 4,6$ en présence de TNF α seul ($p = 0,016$) ; (moyenne de fluorescence obtenue sur 3 expérimentations).

2.2.2 Sur l'expression cellulaire des molécules HLA-DR

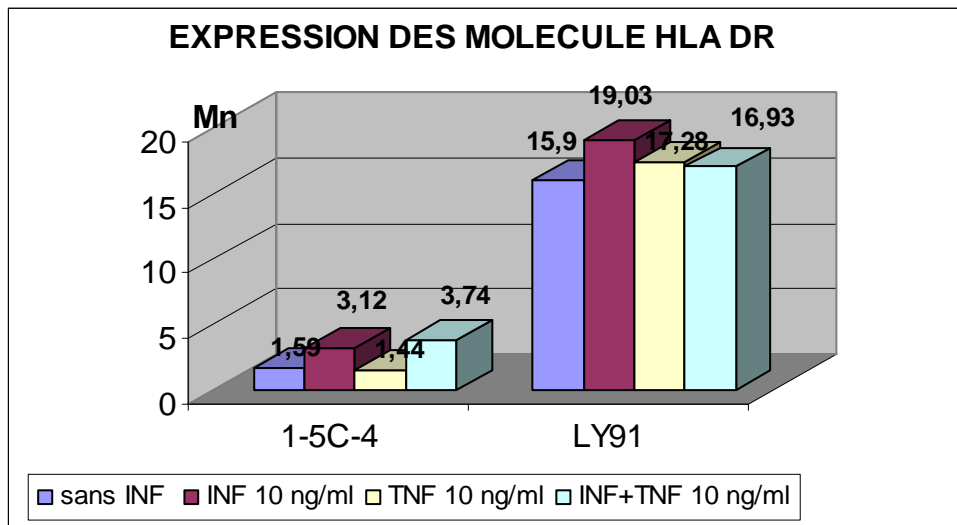


Figure N° 22 : Comparaison de l'effet combiné de l'IFN γ et du TNF α sur l'expression cellulaire des molécules HLA-DR sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée LY-91.

Les cultures de la lignée 1-5C-4, en présence d'IFN γ et du TNF α à des doses de 10 ng/ml, augmente la moyenne d'intensité d'expression des molécules HLA-DR sur la lignée conjonctivale 1-5C-4, de $1,59 \pm 0,3$ à l'état basal, à $3,7 \pm 0,9$ après 48 heures de culture en présence d'IFN γ et de TNF α , ($p = 0,08$). L'expression des molécules HLA-DR sur la lignée LY-91 à l'état basal est de $15,9 \pm 4,15$, l'expression des molécules HLA-DR induites par l'IFN α sur la lignée LY-91 est de $19,03 \pm 2,1$, par contre avec l'IFN α et le TNF γ elle est de $16,9 \pm 6$ et le changement est non significatif.

2.2.3 Sur l'expression cellulaire des molécules HLA-DQ :

La culture en présence d'IFN γ et de TNF α n'a pas permis d'induire d'expression des molécules HLA-DQ sur la lignée conjonctivale.

2.3. Effet du TGFβ1

Nous avons étudié le rôle du TGFβ, cytokine qui semble jouer un rôle majeur dans le développement de la fibrose des pemphigoides, en particulier dans sa forme oculaire. Le TGFβ1 a été ajouté après 24 heures de cultures des lignées cellulaires en présence de d'IFNγ et/ou TNFα.

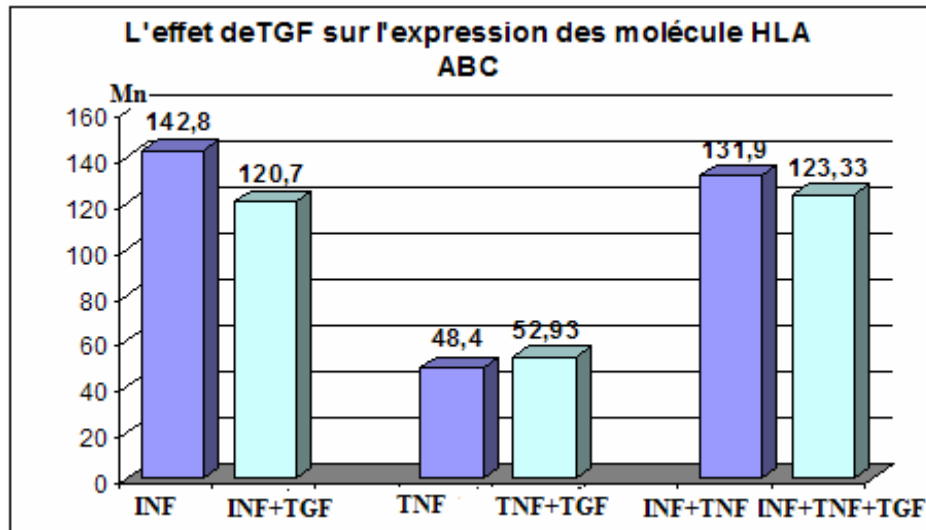


Figure N° 23: Modification de l'expression des molécules de classe I induite par le TGFβ1 sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 cultivée pendant 24 heures en présence d'IFNγ et/ou TNFα.

Le TGFβ1 a diminué l'expression membranaire des molécules HLA-ABC induite par l'IFNγ seul ou associé au TNFα, sur la lignée conjonctivale 1-5C-4. La moyenne de fluorescence des molécules HLA-ABC après 72 heures de culture en présence d'IFNγ seul est de $142,8 \pm 13,2$ et diminue à $120,7 \pm 13,7$ en présence de TGFβ1. Par contre, nous n'avons pas observé de modification significative de l'action du TNFα pour les molécules HLA-ABC sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 (moyenne de fluorescence : $48,4 \pm 11,2$ avec TNFα sans TGFβ1 ; $52,9 \pm 5,8$ en présence de TGFβ1).

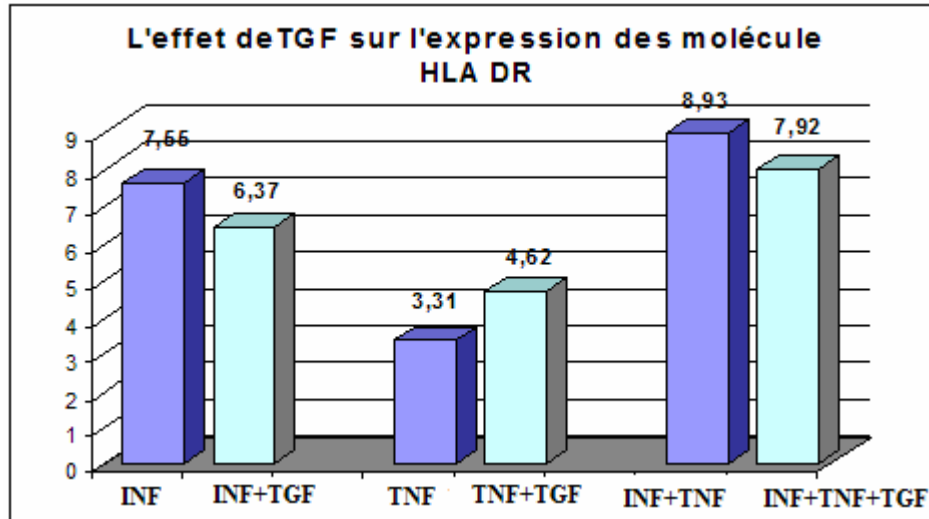


Figure N° 24 : Modification de l'expression des molécules de classe II induite par le TGF β 1 sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 cultivée pendant 24 heures en présence d'INF γ et/ou TNF α .

Le TGF β 1 a diminué l'expression membranaire des molécules HLA-DR induite par l'INF γ seul ou associé au TNF α , sur la lignée conjonctivale 1-5C-4. La moyenne de fluorescence des molécules HLA-DR après 72 heures de culture en présence d'INF γ seul est de $7,55 \pm 1,2$ et en présence de TGF β 1 avec l'INF γ est de $6,4 \pm 0,7$.

La culture en présence TGF β 1 et TNF α n'a pas permis de modifier l'expression des molécules HLA-DR sur la lignée conjonctivale.

La culture en présence TGF β 1 avec INF γ et/ou TNF α n'a pas permis d'induire l'expression membranaire des molécules HLA-DQ sur la lignée conjonctivale 1-5C-4.

III- Empreintes oculaires

Pour évaluer *in vivo* les modifications d'expression des molécules HLA sur les cellules conjonctivales de patients atteints de pemphigoïdes, nous avons effectué une analyse de l'expression des molécules HLA-ABC, DR et DQ sur les cellules conjonctivales obtenues par la technique des empreintes oculaires chez 46 patients. Seuls 26 ont été retenus pour l'analyse car le nombre de cellules recueillies chez les autres patients était trop faible. Le groupe patient présentait une moyenne d'âge de $79,5 \pm 7,9$ ans et comportait 16 femmes et 9 hommes, le groupe de témoins sains présentait une moyenne d'âge de $78,3 \pm 4,1$ ans.

Expression des molécules HLA-ABC

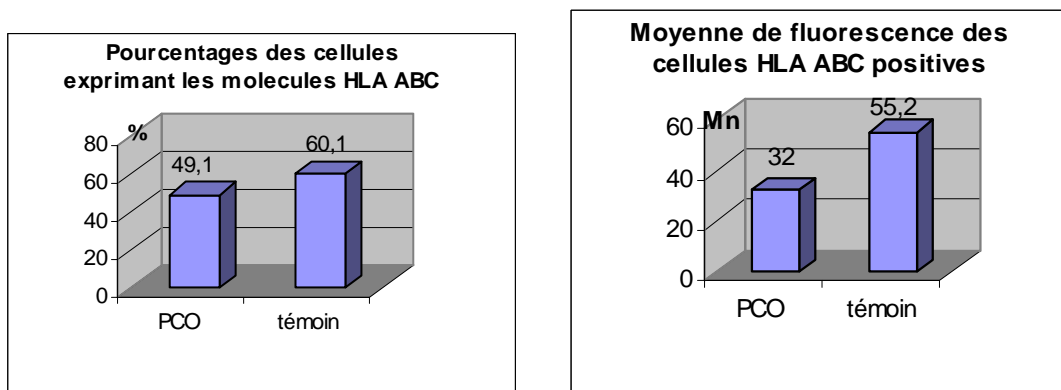


Figure N° 25 : Expression des molécules HLA-ABC sur les cellules conjonctivales *in vivo* : graphe A pourcentage de cellules conjonctivales exprimant les molécules HLA-ABC ; figure B : moyenne de fluorescence des cellules HLA-ABC positives.

Le pourcentage de cellules conjonctivales exprimant les molécules HLA-ABC est de $49,1 \pm 27,1\%$ dans le groupe PCO et $60,1 \pm 36,4\%$ dans le groupe témoin. L'intensité d'expression des molécules HLA-ABC est moins importante pour les patients ($31,9 \pm 37,7$) que pour les témoins ($55,2 \pm 40,3$), mais ces différences ne sont pas significatives.

Expression des molécules HLA-DR

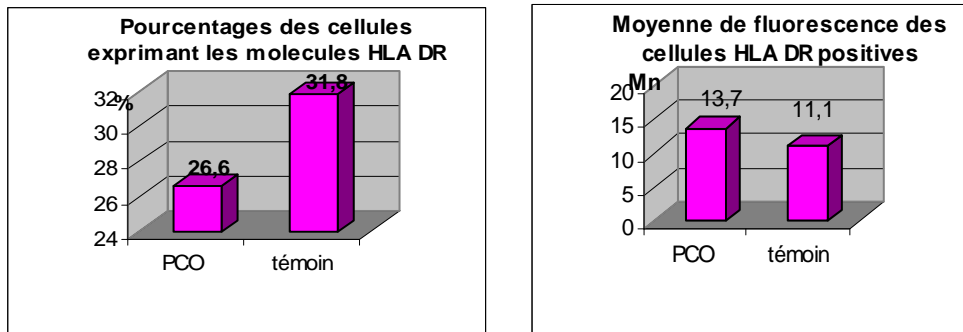


Figure N° 26 : Expression des molécules HLA-DR sur les cellules conjonctivales *in vivo*.

Le pourcentage de cellules conjonctivales exprimant les molécules HLA-DR est $26,6 \pm 28,2$ % dans le groupe PCO et $31,8 \pm 24,4$ % dans le groupe témoin (non significatif). La moyenne des intensités de fluorescence est supérieure chez les patients PCO ($13,7 \pm 22,6$) que chez les témoins ($11,1 \pm 13$) ($p = 0,05$).

Expression des molécules HLA-DQ

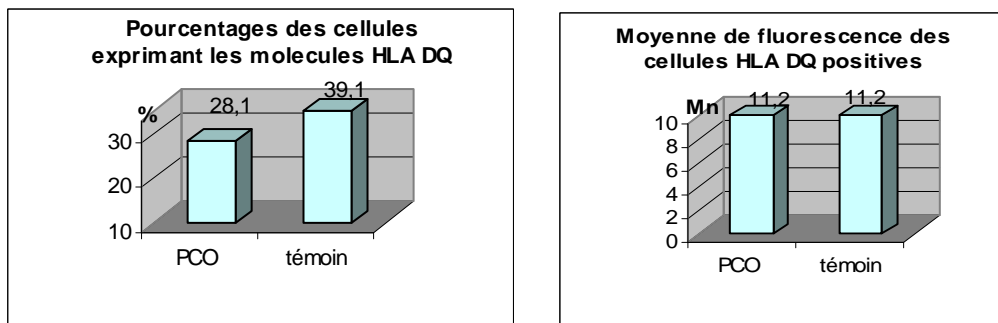


Figure N° 27 : Expression des molécules HLA-DQ sur les cellules conjonctivales *in vivo*.

Le pourcentage de cellules conjonctivales exprimant les molécules HLA-DQ est $28,1 \pm 28,0$ % dans le groupe PCO et $39,1 \pm 28,7$ % dans le groupe témoin (non significatif). La moyenne des intensités de fluorescence est identique chez les patients PCO ($11,2 \pm 18,3$) et les témoins ($11,2 \pm 16,9$).

Au total nous avons observé :

- 1) Une diminution du pourcentage des cellules conjonctivales exprimant des molécules HLA-ABC, DR et DQ chez les patients.
- 2) Une diminution de l'intensité d'expression des molécules HLA-ABC sur les cellules conjonctivales, alors que les molécules HLA de classe II sont au moins aussi fortement exprimées chez les patients que chez les malades .

Cytométrie en flux

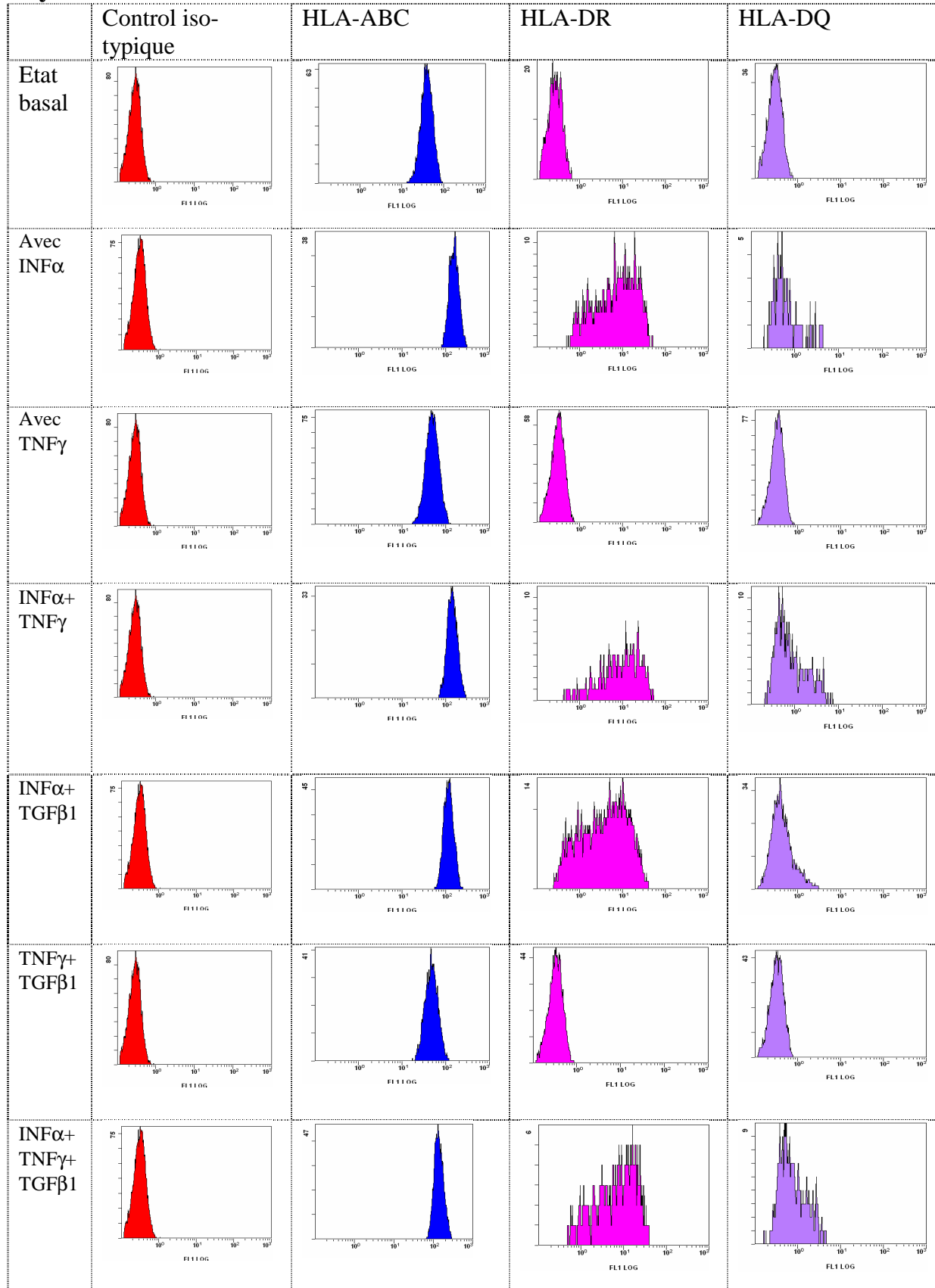


Figure N° 28 : Histogrammes montrant l'expression de surface des molécules HLA sur la lignée conjonctivale 1-5C-4. Les cellules ont été marquées par marquage direct, puis analysées par cytométrie en flux.

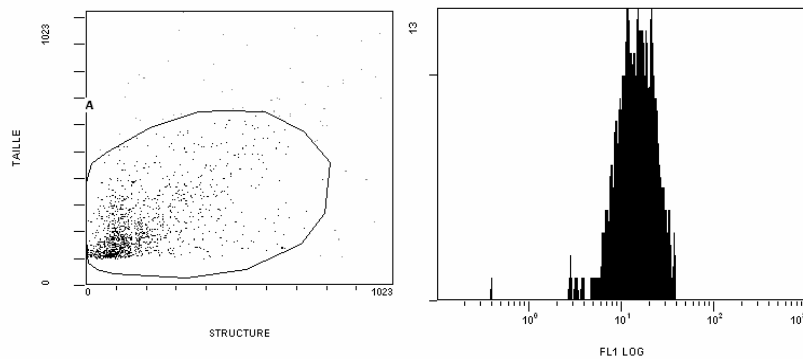


Figure N° 29 : A gauche : Cytogramme en flux taille/structure des cellules conjonctivales obtenu en cytométrie. A droite : histogramme de l'intensité de fluorescence des cellules conjonctivales marquées par l'anti-cytokératine (clone LP3K, isotype IgG1) marqué à la FITC

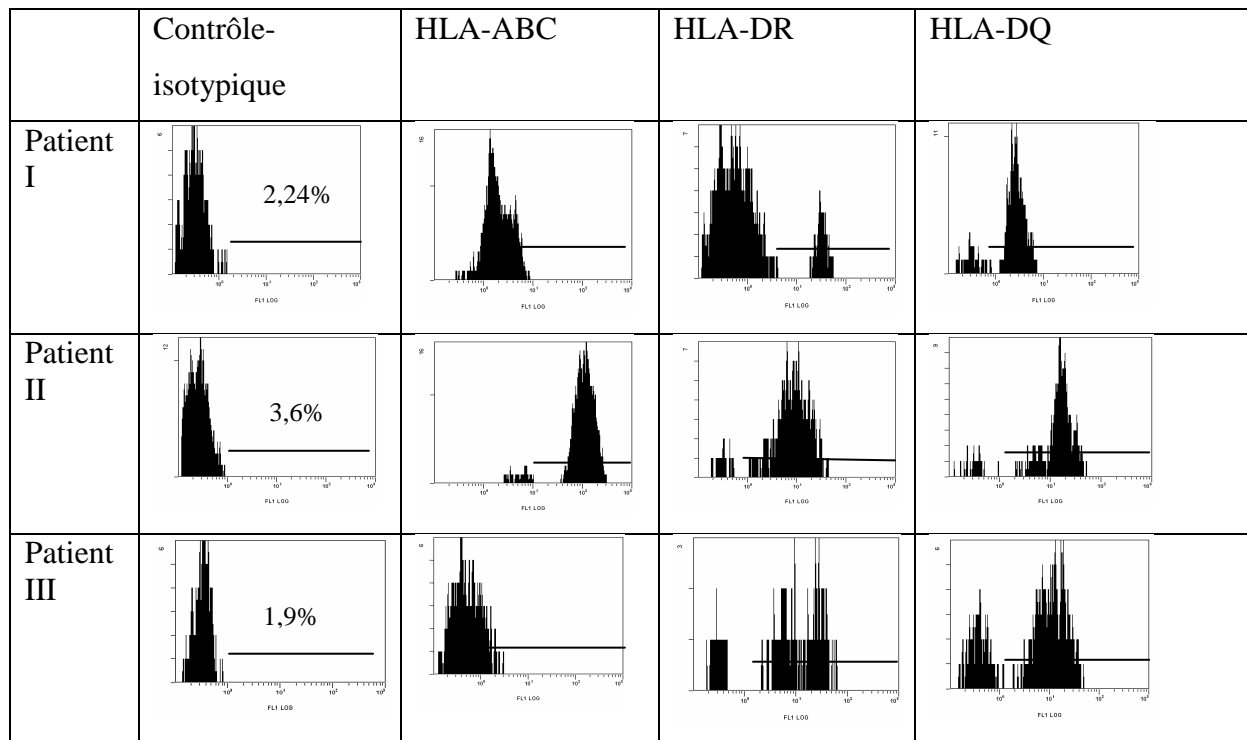


Figure N°30 : Histogrammes montrant l'expression de surface des molécules HLA sur des cellules conjonctivales obtenues par empreintes conjonctivales chez 3 malades. Les cellules ont été marquées par marquage direct, puis analysées par cytométrie en flux. Les colonnes représentent 1) un contrôle isotypique, 2) le marquage avec l'anticorps anti HLA de classe I ,3) le marquage avec l'anticorps anti HLA DR, 4) l'anticorps anti HLA-DQ

Discussion

La protéine BP180 (ou BPAG2) est une des cibles majeures des auto-anticorps impliqués dans les dermatoses bulleuses auto-immunes, en particulier dans les pemphigoïdes bulleuses et cicatricielles. Les auto-anticorps anti BP180 des DBAI peuvent reconnaître différents épitopes de cette protéine. L'expression clinique des pemphigoïdes bulleuses semble différer en fonction de la cible reconnue par les auto-anticorps.

La réponse humorale nécessite la présentation d'un peptide étranger par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) au récepteur T de lymphocyte T helper. La présentation des peptides par le CMH explique pour partie l'existence d'associations HLA et maladie. Les pemphigoïdes cicatricielles sont fortement associées à l'allèle HLA-DQB1*0301 (pemphigoïdes: 33,8 % ; témoins : 22,2 % ; χ^2 corrigé 34,8 ; $p < 0,001$) et se caractérisent par la présence d'anti BP180. Les anti BP180 sont également présents dans les pemphigoïdes bulleuses, affections pour lesquelles l'association HLA-DQB1*0301 est faible. L'épitope cible des anti BP180 pourrait être différent en fonction de l'expression clinique. Nous avons recherché une corrélation entre le phénotype HLA des patients et la cible des anticorps anti BP180. Les études en microscopie électronique permettent de penser que dans la PB les anticorps anti BP180 reconnaissent un épitope pré ou transmembranaire alors que dans la PC les anti BP180 reconnaissent la partie COOH (Bedane *et al.*, 1997). En conséquence, nous avons choisi de développer des tests ELISA pour caractériser la spécificité des auto-anticorps anti BP180: l'un spécifique de la partie trans et juxta membranaires (NH2), et l'autre de la partie carboxy terminale de la protéine (COOH), à l'aide de protéines de fusion. Nous avons tenté d'effectuer un test ELISA avec la protéine BP180 entière, mais nous n'avons pas réussi à effectuer l'amplification de l'ensemble du transcrite de BP180.

Les tests ELISA ont été comparés à la technique de western blot, technique de référence au laboratoire pour la recherche de ces auto-anticorps. L'analyse a été effectuée sur 121 sérums provenant de la sérothèque du service de dermatologie et prélevés sur des patients, tous atteints de DBAI : 23 sérums étaient négatifs par western blot et avec les 2 tests ELISA. Dans 6,6 % des cas (8/121) le test de western blot permet de mettre en évidence un anti BP180, non détecté par les 2 tests ELISA que nous avons développés. Nous avons considéré comme seuil de positivité deux fois la moyenne de densité optique des témoins négatifs. Cinq sérums (4,1%) restaient ininterprétables en raison d'un fort bruit de fond. Dans 4 cas (3,3%) le test ELISA COOH est positif et le test ELISA NH2 est négatif. Trente sérums (24,8%) présentaient un profil ELISA NH2 positif et COOH négatif.

Dans 33,9% des cas (41/121 sérums) un des deux tests ELISA s'est avéré positif alors que le WB est négatif. La sensibilité de l'ELISA (67,8%) apparaît, dans notre étude, supérieure à celle du western blot (47,12%) pour la recherche des anticorps sériques humains dirigés contre BP180. Cette technique se distingue également par sa bonne spécificité. Le test ELISA mis au point par ce travail utilise un fragment NC16a ou un fragment COOH de BP180. Les sérums négatifs en ELISA pourraient donc contenir des anticorps dirigés contre une autre partie de BP180 et cette raison explique la faible sensibilité apparente de l'ELISA mis au point dans cette étude.

Nous avons principalement observé des auto-anticorps anti BP180 dirigés contre la partie NH2 avec 85 sérums positifs (70,2%), la fréquence des anticorps anti COOH n'étant que de 26 sérums positifs (21,49 %). Les observations effectuées en microscopie électronique permettent de penser que l'épitope COOH est une cible spécifique de la pemphigoïde cicatricielle (Bedane *et al.*, 1997) et les résultats de Lee justifient cette observation (Lee *et al.*, 2003). Dans notre étude, pour les sérums dont nous connaissons le diagnostic, la fréquence des anti-BP180-NH2 positif est respectivement de 68,7 % dans la PB (64 cas) et 54,5% dans la PC (11 cas), et la fréquence des anti PB180-COOH est respectivement de 25% (PB) et 4,64% (PC). Sur ces données, l'épitope COOH ne semble pas spécifique de la forme cicatricielle de la maladie. Cette différence peut s'expliquer pour partie par le choix des épitopes. Pour la partie NH2 (NC16A), Zillikens a montré qu'un décalage de 15 acides aminés suffisait pour modifier le pourcentage de sérums réagissant avec la protéine cible dans PB. Nous soulignons que cet auteur observe la même fréquence d'anti BP180-NH2 que celle observée dans notre série (Zillikens *et al.*, 1997). Toutefois le faible nombre de patients atteints de PC inclus dans notre étude peut être un biais à ce résultat.

Nous avons observé une grande variabilité des densités optiques des tests ELISA inter patients. Cette valeur de la DO pourrait avoir un intérêt clinique, soit pour prédire la gravité de la maladie soit pour assurer le suivi thérapeutique. Döpp a montré une corrélation entre la DO auto-anticorps contre PB-180 NH2 et la sévérité de la maladie (Döpp *et al.*, 2000) alors que Schmidt indique une corrélation entre PB et le taux de sérum de anti BP180 avec un traitement mais sans corrélation avec la gravité de la maladie (Schmidt *et al.*, 2000).

Des anti BP230, une autre cible fréquemment observée dans les DBAI, seraient fréquemment associés au BP180 en particulier vis-à-vis de la partie cytoplasmique de PB180 (Oyama *et al.*, 2006). Nous retrouvons cette association sur les sérums de notre étude: sur les 31 sérums positifs pour l'anti BP230 par technique de Western Blot, 80,6 % (25/31) présentaient une réactivité anti BP180-NH2.

Au total, le test ELISA :

1. s'avère plus sensible qu'un test de Western Blot.
2. permet une quantification du taux des auto-anticorps, qui pourrait être corrélée à la clinique.
3. est plus rapide et plus spécifique que le test de Western Blot.
4. peut permettre de caractériser plus précisément la cible des auto-anticorps.

La mise en place de ce test avait pour but de rechercher une corrélation entre la prédisposition conférée par les allèles HLA de classe II et la cible des auto-anticorps. La distribution de fréquences des allèles HLA DRB1, DQB1 dans la population malade ne diffère pas des données de la littérature (Ahmed *et al.*, 1991 ; Yunis *et al.*, 1994 ; Drouet *et al.*, 1998 ; Carozzo *et al.*, 2001) et confirme la forte association HLA-DQB1*0301 et PC. La fréquence des anti BP180-NH2 ou COOH n'est pas différente chez les patients DQB1*0301 positifs et DQB1*0301 négatifs. Par contre, nous avons trouvé une association significative entre la présence de l'allèle HLA-DQB1*0302 et la présence d'anti BP180-NH2 : un anti BP180-NH2 a été détecté chez les dix patients porteurs de cet allèle ($p = 0,04$). Nos conclusions diffèrent de celles de Oyama qui associe la présence d'anti BP180 (tous épitopes confondus) avec la présence des allèles DQB1*0301 DRB1*04 et DRB1*11. Ces auteurs mettent en évidence des anti BP180 chez 76,5 % des malades DQB1*0301 alors que nous observons des anti BP180 chez 65,8% des malades HLA-DQB1*0301 et 69,2% pour l'ensemble des malades. Si nous détectons avec une moindre fréquence des anti BP180 chez les malades que cet auteur, cela peut en partie s'expliquer par le fait que cet auteur a recherché la présence d'anti BP180 vis-à-vis des épitopes couvrant l'ensemble de la protéine BP180 et par une étude portant sur un plus grand nombre de patients. Cette augmentation indique une évaluation indirecte de l'affinité des peptides pour le CMH II, laquelle est expliquée partialement par les propriétés de liaison du peptide au CMH II.

Au total, notre travail permet de montrer une association entre la réponse humorale anti BP180 et les gènes HLA DQB1*0302.

Le PCO, maladie auto-immune concernant l'ensemble de la surface oculaire, provoque une inflammation chronique avec infiltration lymphocytaire. Les molécules HLA-DR sont exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Il a été montré que l'Antigène HLA-DR était exprimé de manière anormale par les cellules épithéliales conjonctivales dans

les conjonctivites chroniques (Brignole *et al.* 2000). Nous nous sommes interrogés sur les modifications d'expression des molécules HLA dans les atteintes oculaires des PC, et sur l'effet des cytokines impliquées dans la PC, sur l'expression des molécules HLA par des études *in vivo* et *in vitro*.

Nous avons cultivé les cellules d'une lignée conjonctivale en présence de cytokines (INF γ , TNF α , TGF β) pour étudier leur effet sur l'expression des molécules HLA. La culture en présence d'INF γ ou TNF α augmente l'expression cellulaire des molécules HLA-DR sur la lignée conjonctivale 1-5C-4 et la lignée lymphoïde LY-91 (lignée utilisé comme contrôle). L'association INF γ et TNF α permet de tripler l'expression des molécules HLA-ABC (moyenne de fluorescence : $25,3 \pm 1,5$ à l'état basal, $82,1 \pm 11,1$ après 48 heures de culture en présence d'INF γ et TNF α ; $p = 0,009$). Il faut souligner que l'expression des molécules HLA-DR, DQ est absente à l'état basal. Si l'expression des molécules HLA-DQ n'a pas été induite par ces cytokines, l'expression des molécules HLA-DR est faiblement induite en présence d'INF γ et TNF α : moyenne de fluorescence $1,59 \pm 0,3$ à l'état basal (non différent des valeurs des contrôles isotypiques) et $3,7 \pm 0,9$ après 48 heures de culture ($p = 0,08$). L'apport de TGF β diminue l'expression cellulaire des molécules HLA induite par l'INF γ et/ou TNF α sur la lignée conjonctivale 1-5C-4.

L'étude *in vivo* a consisté en l'analyse de l'expression des molécules HLA sur les kératinocytes prélevés par empreintes oculaires. Nous avons observé chez les patients comparés à des sujets sains du même âge :

- 1) une diminution du pourcentage de cellules conjonctivales exprimant les molécules HLA-ABC, DR
- 2) une diminution de la moyenne des intensités d'expression des molécules HLA-ABC
- 3) une augmentation de l'intensité de fluorescence de HLA-DR mais cette augmentation est non significative.

Un travail préliminaire effectué au laboratoire par N. Delpuget (données personnelles) a montré la présence de TGF β sur les cultures de cellules conjonctivales de patients atteints de PC. La comparaison des données observées *in vivo* et *in vitro* laisse à penser que la diminution d'expression des molécules HLA à la surface des cellules conjonctivales pourrait être secondaire à la sécrétion de TGF β *in situ*.

Tous nos témoins présentent un contingent de cellules conjonctivales exprimant les molécules HLA-DR et DQ. Ces données sont semblables aux données de Tsubota qui observe la présence de molécules HLA-DR sur 34,2 % des cellules conjonctivales de témoins et de Fujihara qui observe ces molécules chez 30-50% des cellules conjonctivales de témoins sains (Fujihara *et al.*, 1996 ; Tsubota *et al.*, 1999). Par contre Brignole (Brignole *et al.*, 2000) n'observe pas d'expression des molécules DR sur les cellules conjonctivales prélevées par la technique des empreintes dans un groupe de sujets sains. Cet auteur observe une augmentation d'expression HLA-DR chez des patients porteurs de syndrome sec; cette modification d'expression est partiellement corrigée après 3 à 6 mois de traitement (Brignole *et al.*, 2001). Fujihara et Tsubota n'observent pas de modification significative du pourcentage et de l'intensité d'expression des molécules HLA-DR à la surface des cellules conjonctivales de patient atteints de syndrome sec, y compris les patients atteints d'PCO.

Au total :

- 1) Les cellules épithéliales conjonctivales sont capables d'exprimer les molécules HLA de classe II, DR et DQ. L'expression des molécules HLA de classe II est inductible à la surface de ces cellules par l'INF γ et TNF α , mais cette surexpression peut être modulée par l'apport de TGF β . L'expression des molécules de classe II reste modérée, et a donc peu de chances de transformer les cellules conjonctivales en cellules présentatrices d'antigènes.
- 2) Les diminutions d'expression des molécules HLA de classe I (en pourcentage et intensité) sur les cellules conjonctivales des patients pourrait être secondaire à la sécrétion de TGF β ; cette observation est un élément en faveur de l'implication de cette cytokine dans la physiopathologie de l'atteinte oculaire des PCO. La quantification des molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules conjonctivales pourrait être un critère du suivi biologique des patients traités par anti TNF α .

Conclusion

Dans ce travail, nous avons apporté une contribution à l'implication du système HLA dans les pemphigoïdes bulleuses auto-immunes : si le laboratoire a confirmé l'association de la PC à l'allèle HLA DQB1*0301, nous avons mis en évidence que seul l'allèle HLA DQB1*0302 était associé à une réponse contre la partie NH2 de BP180 dans notre étude rétrospective.

La prédisposition génétique conférée par les antigènes HLA à ces affections, et en particulier à la PC, soulève certaines questions. Pourquoi cette affection survient-elle à un âge aussi tardif ? Est-ce en raison de modifications des protéines de la peau ? En effet, au cours du vieillissement, il peut apparaître soit des modifications de séquences soit des modifications de glycosylation des protéines. Ces modifications permettent l'émergence de néo-épitopes qui peuvent être à l'origine d'une réponse auto-immune agressive. Si tel était le cas, les peptides de fusion que nous avons utilisés pour cette étude pourraient ne pas être la cible déclenchante de la réponse immune. La présence d'anticorps contre ces cibles ne serait que la résultante d'une réaction croisée. L'analyse des transcrits de BP180 ou de la structure tridimensionnelle de la protéine pourrait permettre de répondre à cette interrogation.

La réponse immune nécessite une présentation des épitopes par une cellule présentatrice d'antigène. L'apparition de l'expression des molécules HLA DR et DQ à la surface des cellules conjonctivales, expression absente des cellules conjonctivales chez le sujet jeune et sain, pourrait conférer à ces cellules une fonction de cellules présentatrices d'antigènes. Ces modifications d'expression des molécules HLA de classe II à la surface des cellules conjonctivales semblent en rapport avec un phénomène de sénescence puisque ces modifications sont également observées chez les sujets âgés sains.

Bibliographie

Ahmed AR, Foster S, Zaltas M, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ.

Association of DQw7 (DQB1*0301) with ocular cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;88(24):11579-82, (1991).

Ahmed AR., Yunis EJ., Khatri K., Wagner R., Notani G., Awdeh Z., Alper CA.

Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(19):7658-62, (1990).

Allen J., Wojnarowska F.

Linear IgA disease: the IgA and IgG response to the epidermal antigens demonstrates that intermolecular epitope spreading is associated with IgA rather than IgG antibodies, and is more common in adults. *Br J Dermatol.* 149(5):977-85, (2003).

Allen J., Wojnarowska F.

Linear IgA disease: the IgA and IgG response to dermal antigens demonstrates a chiefly IgA response to LAD285 and a dermal 180-kDa protein. *Br J Dermatol.* 149(5):1055-8, (2003).

Amagai M., Klaus-Kovtun V., Stanley JR.

Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell.* 29;67(5):869-77, (1991).

Amo Y., Ohkawa T, Tatsuta M., Hamada Y., Fujimura T., Katsuoka K., Hashimoto T.

Clinical significance of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 26(1):14-8, (2001).

Arechalde A., Braun RP., Calza AM., Hertl M., Didierjean L., Saurat JH., Borradori L.

Childhood bullous pemphigoid associated with IgA antibodies against BP180 or BP230 antigens. *Br J Dermatol.* 140(1):112-8, (1999).

Arentz-Hansen H., Korner R., Molberg O., Quarsten H., Vader W., Kooy YM., Lundin KE., Koning F., Roepstorff P., Sollid LM., McAdam SN.

The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.* 21;191(4):603-12, (2000).

Bach JF.

[History of lymphocytes]*Presse Med.* 23;22(32):1517-21, (1993).

Balding SD., Prost C., Diaz LA., Bernard P., Bedane C., Aberdam D., Giudice GJ.

Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol.* 106(1):141-6, (1996).

[Banfield CC., Wojnarowska F., Allen J., George S., Venning VA., Welsh KI.](#)

The association of HLA-DQ7 with bullous pemphigoid is restricted to men. *Br J Dermatol.* 138(6):1085-90, (1998).

Bedane C., McMillan JR., Balding SD., Bernard P., Prost C., Bonnetblanc JM., Diaz LA., Eady RA., Giudice GJ.

Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida. *J Invest Dermatol.* 108(6):901-7, (1997).

Bedane C., Prost C., Bernard P., Catanzano G., Bonnetblanc JM., Dubertret L.

Cicatricial pemphigoid antigen differs from bullous pemphigoid antigen by its exclusive extracellular localization: a study by indirect immunoelectronmicroscopy. *J Invest Dermatol.* 97(1):3-9, (1991).

Benedicte A., Lie BA., Thorsby E.

Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol.* 17(5):526-31, (2005).

Bernard P., Bedane C., Bonnetblanc JM.

Anti-BP180 autoantibodies as a marker of poor prognosis in bullous pemphigoid: a cohort analysis of 94 elderly patients. *Br J Dermatol.* 136(5):694-8, (1997).

Bernard P., Prost C., Durepaire N., Basset-Seguain N., Didierjean L., Saurat JH.

The major cicatricial pemphigoid antigen is a 180-kD protein that shows immunologic cross-reactivities with the bullous pemphigoid antigen. *J Invest Dermatol.* 99(2):174-9, (1992).

Bernard P., Prost C., Lecerf V., Intrator L., Combemale P., Bedane C., Roujeau JC., Revuz J., Bonnetblanc JM., Dubertret L.

Studies of cicatricial pemphigoid autoantibodies using direct immunoelectron microscopy and immunoblot analysis. *J Invest Dermatol.* 94(5):630-5, (1990).

Bernard P., Vaillant L., Labeille B., Bedane C., Arbeille B., Denoeux JP., Lorette G., Bonnetblanc JM., Prost C.

Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol.* 131(1):48-52, (1995).

Bernard P., Bedane C., Bonnetblanc JM., Borradori L.

maladies bulleuses sous-épidermique acquises auto-immune. in : *Dermatologie et infections sexuellement transmissibles*, 4^{ème} ed. Dir : Saurat JH., Grosshans E., Laugier P., Lachapelle P. Paris : Masson. 308-317, (2004).

Bhol KC., Colon JE., Ahmed AR.

Autoantibody in mucous membrane pemphigoid binds to an intracellular epitope on human beta4 integrin and causes basement membrane zone separation in oral mucosa in an organ culture model. *J Invest Dermatol.* 120(4):701-2, (2003).

Bidwell JL., Bidwell EA., Savage DA., Middleton D., Klouda PT., Bradley BA.

A DNA-RFLP typing system that positively identifies serologically well-defined and ill-defined HLA-DR and DQ alleles, including DRw10. *Transplantation.* 45(3):640-6, (1988).

Bjorkman PJ., Strominger JL., Wiley DC.

Crystallization and X-ray diffraction studies on the histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-A28 from human cell membranes. *J Mol Biol.* 5;186(1):205-10, (1985).

Bodmer JG., Marsh SG., Albert ED., Bodmer WF., Dupont B., Erlich HA., Mach B., Mayr WR., Parham P., Sasazuki T, et al.

Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Eur J Immunogenet.* 19(5):327-44, (1992).

Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI.

Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Vox Sang.* 73(2):105-30, (1997).

Borradori L., Sonnenberg A.

Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr Opin Cell Biol.* 8(5):647-56, (1996).

Borradori L., Sonnenberg A.

Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol.* 112(4):411-8, (1999).

Brown JH., Jardetzky TS., Gorga JC., Stern LJ., Urban RG., Strominger JL., Wiley DC.

Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 1;364(6432):33-9, (1993).

Brignole F., Pisella PJ., De Saint Jean M., Goldschild M., Goguel A., Baudouin C.

Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(1):90-5, (2001).

Brignole F., Ppisella P-J., Ggoldschild M., De saint jean M., Ggoguel A., Bbaudouin C.*

Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells in patients with dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41(6):1356-63. (2000).

Budinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Merk HF, Yancey K, Hertl M.

Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest.* 15;102(12):2082-9,(1998).

Burgeson RE., Christiano AM.

The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 9(5):651-8, (1997).

Carrozzo M, Fasano ME, Broccoletti R, Carbone M, Cozzani E, Rendine S, Roggero S, Parodi A, Gandolfo S.

HLA-DQB1 alleles in Italian patients with mucous membrane pemphigoid predominantly affecting the oral cavity. *Br J Dermatol.* 145(5):805-8, (2001).

Castellino F., Zappacosta F., Coligan JE., Germain RN.

Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. *J Immunol.* 15;161(8):4048-57, (1998).

Castellino F., Zhong G., Germain RN.

Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol.* 54(2):159-69, (1997).

Chan FL., Inoue S., Leblond CP.

The basement membranes of cryofixed or aldehyde-fixed, freeze-substituted tissues are composed of a lamina densa and do not contain a lamina lucida. *Cell Tissue Res.* 273(1):41-52, (1993).

Chan LS., Ahmed AR., Anhalt GJ., Bernauer W., Cooper KD., Elder MJ., Fine JD., Foster CS, Ghohestani R., Hashimoto T., Hoang-Xuan T., Kirtschig G., Korman NJ., Lightman S., Lozada-Nur F., Marinkovich MP., Mondino BJ., Prost-Squarcioni C., Rogers RS 3rd, Setterfield JF., West DP., Wojnarowska F., Woodley DT., Yancey KB., Zillikens D., Zone JJ. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol.* 138(3):370-9, (2002).

Chan LS., Hammerberg C., Cooper KD.

Significantly increased occurrence of HLA-DQB1*0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 108(2):129-32, (1997).

Chan LS., Majmudar AA., Tran HH., Meier F., Schaumburg-Lever G., Chen M., Anhalt G., Woodley DT., Marinkovich MP.

Laminin-6 and laminin-5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 108(6):848-53, (1997).

Cheng X., Den Z., Koch PJ.

Desmosomal cell adhesion in mammalian development. *Eur J Cell Biol.* 84(2-3):215-23, (2005).

Cheng X., Koch PJ.

In vivo function of desmosomes. *J Dermatol.* 31(3):171-87, (2004).

Chicz RM., Urban RG., Gorga JC., Vignali DA., Lane WS., Strominger JL.

Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med.* 1;178(1):27-47, (1993).

Chicz RM., Urban RG., Lane WS., Gorga JC., Stern LJ., Vignali DA., Strominger JL.

redominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature.* 27;358(6389):764-8, (1992).

Colbert RL., Allen DM., Eastwood D., Fairley JA.

Mortality rate of bullous pemphigoid in a US medical center. *J Invest Dermatol.* 122(5):1091-5, (2004).

Collier PM., Kelly SE., Wojnarowska F.

Linear IgA disease and pregnancy. *J Am Acad Dermatol.* 30(3):407-11, (1994).

Colombani J.

HLA.fonction immunitaires et applications medicales. Ed.John Libbey Eurotext.(1993).

Cresswell P.

Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr Opin Immunol.* 4(1):87-92, (1992).

Cresswell P.

Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*. 84(4):505-7, (1996).

Degen E., Cohen-Doyle MF., Williams DB.

Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta 2-microglobulin and peptide. *J Exp Med*. 1;175(6):1653-61, (1992).

Delpuget-Bertin Noëlle.

Realisation d'un modele experimental de pemphigoïde cicatricielle oculaire. DEA national de biologie et pharmacologie cutanees. Faculté de médecine de limoges (1990).

Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, Yunis JJ, Morton ED, Bhol K, Norman R, Alper CA, Good RA, Ahmed R.

A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6;93(16):8569-71, (1996).

Delgado JC., Yunis DE., Bozon MV., Salazar M., Deulofeut R., Turbay D., Mehra NK., Pasricha JS., Raval RS., Patel H., Shah BK., Bhol K., Alper CA., Ahmed AR., Yunis EJ.

MHC class II alleles and haplotypes in patients with pemphigus vulgaris from India. *Tissue Antigens*. 48(6):668-72, (1996).

Delvig AA., Robinson JH.

Two T cell epitopes from the M5 protein of viable *Streptococcus pyogenes* engage different pathways of bacterial antigen processing in mouse macrophages. *J Immunol*. 1;160(11):5267-72, (1998).

Deng H., Apple R., Clare-Salzler M., Trembleau S., Mathis D., Adorini L., Sercarz E.

Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease. *J Exp Med*. 1;178(5):1675-80, (1993).

Deng H., Fosdick L., Sercarz E.

The involvement of antigen processing in determinant selection by class II MHC and its relationship to immunodominance. *APMIS*. 101(9):655-62, (1993).

Dessen A., Lawrence CM., Cupo S., Zaller DM., Wiley DC.

X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*. 7(4):473-81, (1997).

Dopp R., Schmidt E., Chimanovitch I., Leverkus M., Brocker EB., Zillikens D.

IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol*. 42(4):577-83, (2000).

Drouet M., Delpuget-Bertin N., Vaillant L., Chauchaix S., Boulanger MD, Bonnetblanc JM, Bernard P.

HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genes in susceptibility and resistance to cicatricial pemphigoid in French Caucasians. *Eur J Dermatol*. 8(5):330-3, (1998).

Elliott EA., Drake JR., Amigorena S., Elsemore J., Webster P., Mellman I., Flavell RA.

The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med*. 1;179(2):681-94, (1994).

Favre B., Fontao L., Koster J., Shafaatian R., Jaunin F., Saurat JH., Sonnenberg A., Borradori L.

The hemidesmosomal protein bullous pemphigoid antigen 1 and the integrin beta 4 subunit bind to ERBIN. Molecular cloning of multiple alternative splice variants of ERBIN and analysis of their tissue expression. *J Biol Chem*. 2001 Aug 31;276(35):32427-36. Epub, (2001).

Fox JW., Mayer U., Nischt R., Aumailley M., Reinhardt D., Wiedemann H., Mann K., Timpl R., Krieg T., Engel J., et al.

Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J*. 10(11):3137-46, (1991).

Frandji P., Oskeritzian C., Cacaraci F., Lapeyre J., Peronet R., David B., Guillet JG., Mecheri S.

Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J Immunol.* ,(1993).

Fujihara T., Takeuchi T., Saito K., Tsubota K.

Flow cytometric analysis of surface antigens on human conjunctival epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 29(2):103-9, (1997).

Garrod DR.

Intercellular junctions in normal epidermis. *Exp Dermatol.* 13(10):652-3, (2004).

Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar JJ., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M., Stern PL.

Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 18(2):89-95, (1997).

Germain S., Bonnet F., Philippe J., Fuchs S., Corvol P., Pinet F.

A novel distal enhancer confers chorionic expression on the human renin gene. *J Biol Chem.* 273(39):25292-300, (1998).

Getsios S., Amargo EV., Dusek RL., Ishii K., Sheu L., Godsel LM., Green KJ.

Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation.* 72(8):419-33, (2004).

Ghosh A., Joshi VD., Shaila MS.

Characterization of an in vitro transcription system from rinderpest virus. *Vet Microbiol.* 44(2-4):165-73, (1995).

Giudice GJ., Emery DJ., Diaz LA.

Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol.* 99(3):243-50, (1992).

Hashimoto T., Nie Z.

IgA antibodies of cicatricial pemphigoid sera specifically react with C-terminus of BP180. *J Invest Dermatol.* 112(2):254-5, (1999).

Hata Y., Fujii Y., Tsunoda K., Amagai M.

Production of the entire extracellular domain of BP180 (type XVII collagen) by baculovirus expression. *J Dermatol Sci.* 23(3):183-90, (2000).

[Hirako Y., Nishizawa Y., Sitaru C., Opitz A., Marcus K., Meyer HE., Butt E., Owaribe K., Zillikens D.](#)

The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) fragments of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen have different N-termini. *J Invest Dermatol.* 121(6):1554-6, (2003).

Horiguchi Y., Couchman JR., Ljubimov AV., Yamasaki H., Fine JD.

Distribution, ultrastructural localization, and ontogeny of the core protein of a heparan sulfate proteoglycan in human skin and other basement membranes. *J Histochem Cytochem.* 37(7):961-70, (1989).

Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering RC., Bruford EA., Khodiyar VK., Lush MJ., Povey S., Talbot CC Jr., Wright MW., Wain HM., Trowsdale J., Ziegler A., Beck S.

Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* 5(12):889-99, (2004).

Hunt DF., Michel H., Dickinson TA., Shabanowitz J., Cox AL, Sakaguchi K., Appella E., Grey HM., Sette A.

Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science.* 26;256(5065):1817-20, (1992).

Ishiko A., Shimizu H., Kikuchi A., Ebihara T., Hashimoto T., Nishikawa T.

Human autoantibodies against the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) bind only to the intracellular domain of the hemidesmosome, whereas those against the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2) bind along the plasma membrane of the hemidesmosome in normal human and swine skin. *J Clin Invest.* 91(4):1608-15, (1993).

Kelly S., Wojnarowska F.

Pemphigoid gestationis. *Eur J Dermatol.* 4(1): 16-20, (1994).

Klein J.

Evolution and function of the major histocompatibility system : facts and speculations. In : Götze D., ed. the major histocompatibility system in man and animals; Berlin : springer verlag: 339-78, (1977).

Kobayashi M., Amagai M., Kuroda-Kinoshita K., Hashimoto T., Shirakata Y., Hashimoto K., Nishikawa T.

BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 30(3):224-32, (2002).

Kowalczyk AP., Bornslaeger EA., Norvell SM., Palka HL., Green KJ.

Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol.* 185:237-302, (1999).

Kuffer R.

Aspects buccaux de la pemphigoid cicatricielle. Que reste-t-il de la « gingivite desquamative » ?. *Ann Dermatol Venereol* 103 : 637-641, (1994).

Kuffer R.

[Oral aspects of cicatricial pemphigoid. What is left of "desquamative gingivitis"?] *Ann Dermatol Venereol.* 114(4):621-30, (1987).

Labib RS., Anhalt GJ., Patel HP., Mutasim DF., Diaz LA.

Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol.* 15;136(4):1231-5, (1986).

Laffitte E., Skaria M., Jaunin F., Tamm K., Saurat JH., Favre B., Borradori L.

Autoantibodies to the extracellular and intracellular domain of bullous pemphigoid 180, the putative key autoantigen in bullous pemphigoid, belong predominantly to the IgG1 and IgG4 subclasses. *Br J Dermatol.* 144(4):760-8, (2001).

Lazarova DL., Bordonaro M., Sartorelli AC.

Transcriptional regulation of the vitamin D(3) receptor gene by ZEB. *Cell Growth Differ.* 12(6):319-26, (2001).

Lee JB., Liu Y., Hashimoto T.

Cicatricial pemphigoid sera specifically react with the most C-terminal portion of BP180. *J Dermatol Sci.* 32(1):59-64, (2003).

Leverkus M., Bhol K., Hirako Y., Pas H., Sitaru C., Baier G., Brocker EB., Jonkman MF., Ahmed AR., Zillikens D.

Cicatricial pemphigoid with circulating autoantibodies to beta4 integrin, bullous pemphigoid 180 and bullous pemphigoid 230. *Br J Dermatol.* 145(6):998-1004, (2001).

Leverkus M., Georgi M., Nie Z., Hashimoto T., Brocker EB., Zillikens D.

Cicatricial pemphigoid with circulating IgA and IgG autoantibodies to the central portion of the BP180 ectodomain: beneficial effect of adjuvant therapy with high-dose intravenous immunoglobulin. *J Am Acad Dermatol.* 46(1):116-22, (2002).

Lin MS., Gharia M., Fu CL., Olague-Marchan M., Hacker M., Harman KE., Bhogal BS., Black MM., Diaz LA., Giudice GJ.

Molecular mapping of the major epitopes of BP180 recognized by herpes gestationis autoantibodies. *Clin Immunol.* 92(3):285-92, (1999).

Liu Z., Diaz LA., Troy JL., Taylor AF., Emery DJ., Fairley JA., Giudice GJ.

A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest.* 92(5):2480-8, (1993).

Liu Z., Giudice GJ., Zhou X., Swartz SJ, Troy JL., Fairley JA., Till GO., Diaz LA.

A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* 1;100(5):1256-63, (1997).

Liu Z., Shapiro SD., Zhou X., Twining SS., Senior RM., Giudice GJ., Fairley JA., Diaz LA.

A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* 105(1):113-23, (2000).

Lombardi ML., Mercurio O., Tecame G., Fusco C., Ruocco V., Salerno A., Pirozzi G., Manzo C.

Molecular analysis of HLA-DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens*. 47(3):228-30, (1996).

Machet MC., Arbeille B., Vaillant L.

Desmosomes and acantholytic diseases. *Ann Dermatol Venereol*. 121(8):581-93,1(994).

Marsh SG.

Nomenclature for factors of the HLA system, update September/October 1997. *Tissue Antigens*. 51(3):315-6. , (1998).

Marsh SG., Albert ED., Bodmer WF., Bontrop RE, Dupont B., Erlich HA., Geraghty DE., Hansen JA., Hurley CK., Mach B., Mayr WR., Parham P., Petersdorf EW., Sasazuki T., Schreuder GM., Strominger JL., Svejgaard A., Terasaki PI., Trowsdale J

Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens*. 65(4):301-69, (2005).

Maric MA., Taylor MD., Blum JS.

Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;91(6):2171-5, (1994).

Matsuyama M., Hashimoto K., Yamasaki Y., Shirakura R., Higuchi R., Miyajima T., Amemiya H.

HLA-DR antigens in pemphigus among Japanese. *Tissue Antigens*. 17(2):238-9, (1981).

Matsuzaki Y., Tamai K., Kon A., Sawamura D., Uitto J., Hashimoto I.

Keratinocyte responsive element 3: analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene promoter. *J Invest Dermatol*. 120(2):308-12, (2003).

Miller S., Dykes D., Polesky H.

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 11;16(3):1215, (1988).

Miyagawa S., Amagai M., Niizeki H., Yamashina Y., Kaneshige T., Nishikawa T., Shirai T., Inoko H.

HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. *Tissue Antigens*. 54(4):333-40., (1999).

Moraes JR., Luo Y., Moraes ME., Stastny P.

Clinical relevance of antibodies to non-HLA antigens in organ transplantation. *Clin Lab Med*. 11(3):621-32,(1991).

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*. 139(3):365-70, (1998).

Neefjes JJ., Momburg F.

Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 5(1):27-34, (1993).

Nestor MS., Cochran AJ., Ahmed AR.

Mononuclear cell infiltrates in bullous disease. *J Invest Dermatol*. 88(2):172-5, (1987).

Niessen CM., Hogervorst F., Jaspars LH., de Melker AA., Delwel GO., Hulsman EH., Kuikman I., Sonnenberg A.

The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res*. 211(2):360-367, (1994).

North AJ., Bardsley WG., Hyam J., Bornslaeger EA., Cordingley HC., Trinnaman B., Hatzfeld M., Green KJ., Magee AI., Garrod DR.

Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci*. 112 (Pt 23):4325-36, (1999).

Nykvist P., Tasanen K., Viitasalo T., Kapyla J., Jokinen J., Bruckner-Tuderman L., Heino J.

The cell adhesion domain of type XVII collagen promotes integrin-mediated cell spreading by a novel mechanism. *J Biol Chem*. 19;276(42):38673-9. Epub 2001 Aug 20, (2001).

Odorizzi CG., Trowbridge IS., Xue L., Hopkins CR., Davis CD., Collawn JF.

Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol.* 126(2):317-30, (1994).

Olerup O., Aldener A., Fogdell A.

HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens.*;41(3):119-34, (1993).

Olivry T., Dunston SM., Fahey M., Nguyen N., Marinkovich MP.

Autoantibodies against the processed ectodomain of collagen XVII (BPAG2, BP180) define a canine homologue of linear IgA disease of humans. *Vet Pathol.* 37(4):302-9, (2000).

Oostingh GJ., Sitaru C., Kromminga A., Dormann D., Zillikens D.

Autoreactive T cell responses in pemphigus and pemphigoid. *Autoimmun Rev.* 1(5):267-72, (2002).

Oyama N., Setterfield JF., Powell AM., Sakuma-Oyama Y., Albert S., Bhogal BS., Vaughan RW., Kaneko F., Challacombe SJ., Black MM.

Bullous pemphigoid antigen II (BP180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. *Br J Dermatol.* 154(1):90-8, (2006).

Payen JL., Pienkowski P., Suduca JM., Bonafe JL., Escourrou J., Frexinos J., Ribet A. [Cicatricial pemphigoid. A rare cause of esophageal stenosis] *Gastroenterol Clin Biol.* 13(11):948-9, (1989).

Perez-Moreno M., Jamora C., Fuchs E.

Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 21;112(4):535-48, (2003).

Pieters J., Bakke O., Dobberstein B.

The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci.* 106 (Pt 3):831-46, (1993).

[Pisella PJ., Brignole F., Debbasch C., Lozato PA., Creuzot-Garcher C., Bara J., Saiag P., Warnet JM., Baudouin C.](#)

Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology*. 107(10):1841-9, (2000).

Powis SJ., Deverson EV., Coadwell WJ., Ciruela A., Huskisson NS., Smith H., Butcher GW., Howard JC.

Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature*. 21;357(6375):211-5, (1992).

Prost C., De Leca AC., Combemale P., Labeille B., Martin N., Cosnes A., Guillaume JC., Venencie PY., Verret JL., Dubertret L., et al.

Diagnosis of adult linear IgA dermatosis by immunoelectronmicroscopy in 16 patients with linear IgA deposits. *J Invest Dermatol*. 92(1):39-45, (1989).

Prost C., Labeille B., Chaussade V., Guillaume JC., Martin N., Dubertret L.

Immunoelectron microscopy in subepidermal autoimmune bullous diseases: a prospective study of IgG and C3 bound in vivo in 32 patients. *J Invest Dermatol*. 89(6):567-73, (1987).

Quondamatteo F.

Assembly, stability and integrity of basement membranes in vivo. *Histochem J*. 34(8-9):369-81, (2002).

Rammensee HG., Friede T., Stevanović S.

MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41(4):178-228, (1995).

Razzaque MS., Ahmed BS., Foster CS., Ahmed AR.

Effects of IL-4 on conjunctival fibroblasts: possible role in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol. Vis Sci*44(8):3417-23, (2003).

Razzaque MS., Foster CS., Ahmed AR.

Role of collagen-binding heat shock protein 47 and transforming growth factor-beta1 in conjunctival scarring in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.;44(4):1616-21, (2003).

Roche P., Debelle F., Lerouge P., Vasse J., Truchet G., Prome JC., Denarie J.
The lipo-oligosaccharidic symbiotic signals of *Rhizobium meliloti*. *Biochem Soc Trans.* 20(2):288-91, (1992).

Roh JY., Yee C., Lazarova Z., Hall RP., Yancey KB.
The 120-kDa soluble ectodomain of type XVII collagen is recognized by autoantibodies in patients with pemphigoid and linear IgA dermatosis. *Br J Dermatol.* 143(1):104-11, (2000).

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.* 134(4):465-9, (1998).

Rudensky AY., Preston-Hurlburt P., Hong SC., Barlow A., Janeway CA Jr.
Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature.* 353(6345):622-7, (1991).

Runnels HA., Weber DA., Moore JC., Westerman LE., Jensen PE..
Intact proteins can bind to class II histocompatibility molecules with high affinity. *Mol Immunol.* 34(6):471-80, (1997).

Saiki RK., Scharf S., Faloona F., Mullis KB., Horn GT., Erlich HA., Arnheim N.
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732):1350-4, (1985).

Salmon-Ehr V., Bernard P.
[Physiopathology of autoimmune bullous dermatoses of the basement membrane. *Ann Dermatol Venereol.* 125(11):817-23, (1998).

Sanger F., Nicklen S., Coulson AR.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;74(12):5463-7, (1977).

Schmidt E., Obe K., Brocker EB., Zillikens D.

Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 136(2):174-8, (2000).

Schmidt E., Reimer S., Kruse N., Jainta S., Brocker EB., Marinkovich MP., Giudice GJ., Zillikens D.

Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 115(5):842-8, (2000).

Schmidt E., Skrobek C., Kromminga A., Hashimoto T., Messer G., Brocker EB., Yancey KB., Zillikens D.

Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol.* 145(5):778-83, (2001).

Seth A., Stern LJ., Ottenhoff TH., Engel I., Owen MJ., Lamb JR., Klausner RD., Wiley DC. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen in vitro. *Nature.* 26;369(6478):324-7,1(994).

Shornick JK., Jenkins RE., Artlett CM., Briggs DC., Welsh KI., Kelly SE., Garvey MP., Black MM.

Class II MHC typing in pemphigoid gestationis. *Clin Exp Dermatol.* 20(2):123-6, (1995).

Shiina T., Inoko H., Kulski JK.

An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens.* 64(6):631-49, (2004).

Shimanovich I., Skrobek C., Rose C., Nie Z., Hashimoto T., Brocker EB., Zillikens D.

Pemphigoid gestationis with predominant involvement of oral mucous membranes and IgA autoantibodies targeting the C-terminus of BP180. *J Am Acad Dermatol.* 47(5):780-4, (2002).

Shinojima Y., Ochiai T., Kawamura A., Arakawa H., Fukuda K., Hashimoto T.

A case of bullous pemphigoid associated with autoantibodies targeting antigenic sites other than the NC16a domain of BP180. *Clin Exp Dermatol.* 30(5):503-5, (2005).

Silke C., Hofmann S., Thoma-Uszynski S., Hunziker T., Bernard P., Koebnick C., Stauber A., Schuler G., Borradori L., Hertl M.

Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH₂- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. *J Invest Dermatol.* 119(5):1065-73, (2002).

Simmonds MJ., Gough SC.

Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. *Br Med Bull.* 8;71:93-113, (2005).

Sitaru C., Powell J., Messer G., Brocker EB., Wojnarowska F., Zillikens D.

Immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pemphigoid gestationis. *Obstet Gynecol.* 103(4):757-63, (2004).

Sitaru C., Powell J., Shimanovich I., Jainta S., Kirtschig G., Wojnarowska F., Zillikens D.

Pemphigoid gestationis: maternal sera recognize epitopes restricted to the N-terminal portion of the extracellular domain of BP180 not present on its shed ectodomain. *Br J Dermatol.* 149(2):420-2, (2003).

Smith KJ., Pyrdol J., Gauthier L., Wiley DC., Wucherpfennig KW.

Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med.* 19;188(8):1511-20, (1998).

Spinardi L., Einheber S., Cullen T., Milner TA., Giancotti FG.

A recombinant tail-less integrin beta 4 subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress alpha 6 beta 4-mediated cell adhesion to laminins. *J Cell Biol.* 129(2):473-87, (1995).

Stern LJ., Brown JH., Jardetzky TS., Gorga JC., Urban RG., Strominger JL., Wiley DC.

Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 17;368(6468):215-21, (1994).

Stewart CA., Horton R., Allcock RJ., shurst JL., Atrazhev AM., Coggill P., Dunham I., Forbes S., Halls K., Howson JM., Humphray SJ., Hunt S., Mungall AJ., Osoegawa K., Palmer

S., Roberts AN., Rogers J., Sims S., Wang Y., Wilming LG., Elliott JF., de Jong PJ., Sawcer S., Todd JA., Trowsdale J., Beck S.A.

Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res.*;14(6):1176-87, (2004).

Suzuki M., Harada S., Yaoita H.

Purification of bullous pemphigoid IgG subclasses and their capability for complement fixation. *Acta Derm Venereol.* 72(4):245-9, (1992).

Tait BD., Colman PG., Morahan G., Marchinovska L., Dore E., Gellert S., Honeyman MC., Stephen K., Loth A.

HLA genes associated with autoimmunity and progression to disease in type 1 diabetes. *Tissue Antigens.* 61(2):146-53, (2003).

Tauber J., Jabbur N., Foster CS.

Improved detection of disease progression in ocular cicatricial pemphigoid. *Cornea.* 11(5):446-51, (1992).

Taylor G., Venning V., Wojnarowska F., Welch K.

Bullous pemphigoid and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol.* 29(2 Pt 1):181-4, (1993).

Teyton L., O'Sullivan D., Dickson PW., Lotteau V., Sette A., Fink P., Peterson PA.

Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways.

Nature. 1;348(6296):39-44, (1990).

Tomas, Fleming TE., Korman NJ.

Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 43(4):571-91; quiz 591-4, (2000).

Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsend A., Kelly A.

Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature.* 20-27;348(6303):741-4, (1990).

Tsubota K., Fukagawa K., Fujihara T., Shimmura S., Saito I., Saito K., Takeuchi T.
Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(1):28-34, (1999).

Van den Bergh F., Giudice GJ.
BP180 (type XVII collagen) and its role in cutaneous biology and disease. *Adv Dermatol.* 19:37-71, (2003).

Venning VA., Taylor CJ., Ting A., Wojnarowska F.
HLA type in bullous pemphigoid, cicatricial pemphigoid and linear IgA disease. *Clin Exp Dermatol.* 14(4):283-5, (1989).

Viville S., Neefjes J., Lotteau V., Dierich A., Lemeur M., Ploegh H., Benoist C., Mathis D.
Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell.* 26;72(4):635-48, (1993).

Woodley DT., O'Keefe EJ., Reese MJ., Mechanic GL., Briggaman RA., Gammon WR.
Epidermolysis bullosa acquisita antigen, a new major component of cutaneous basement membrane, is a glycoprotein with collagenous domains. *J Invest Dermatol.* 86(6):668-72, (1986).

Xu L., Olivry T., Chan LS.
Molecular cloning of a cDNA encoding the porcine type XVII collagen noncollagenous 16 A domain and localization of the domain to the upper part of porcine skin basement membrane zone. *Vet Dermatol.* 15(3):146-51, (2004).

Yeatman N., Sachs J., Bottazzo GF.
Autoimmunity--towards the year 2001. *Immunol Today.* 13(7):239-40, (1992).

Yin T., Getsios S., Caldelari R., Godsel LM., Kowalczyk AP., Muller EJ., Green KJ.
Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 280(48):40355-63, (2005).

[Yunis JJ., Mobini N., Yunis EJ., Alper CA., Deulofeut R., Rodriguez A., Foster CS., Marcus-Bagley D., Good RA., Ahmed AR.](#)

Common major histocompatibility complex class II markers in clinical variants of cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;91(16):7747-51, (1994).

Zaltas MM., Ahmed R., Foster CS.

Association of HLA-DR4 with ocular cicatricial pemphigoid. *Curr Eye Res.* 8(2):189-93, (1989).

Zambruno G., Failla CM.

Autoimmunity of the dermal-epidermal junction. *Eur J Dermatol.* 9(6):437-42, (1999).

Zillikens D., Herzele K., Georgi M., Schmidt E., Chimanovitch I., Schumann H., Mascaro JM Jr., Diaz LA., Bruckner-Tuderman L., Brocker EB., Giudice GJ.

Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol.* 113(6):947-53, (1999).

Zillikens D., Mascaro JM., Rose PA., Liu Z., Ewing SM., Caux F., Hoffmann RG., Diaz LA., Giudice GJ.

A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 109(5):679-83, (1997).

Zillikens D.

BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes. *Keio J Med.* 51(1):21-8, (2002).

Zinkernagel RM., Doherty PC.

MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol.* 27:51-177, (1979).

Zipp F., Windemuth C., Pankow H., Dichgans J., Wienker T., Martin R., Muller C.

Multiple sclerosis associated amino acids of polymorphic regions relevant for the HLA antigen binding are confined to HLA-DR2. *Hum Immunol.* 61(10):1021-30, (2000).

Zone JJ., Taylor TB., Meyer LJ., Petersen MJ.

The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2. *J Invest Dermatol.* 110(3):207-10, (1998).