HAL
open science

LE ROLE DE L'AUTOANTIGENE DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES : ETUDE DE LA DESMOGLEINE 1 AU COURS DES PEMPHIGUS

Hugo Mouquet

To cite this version:

Hugo Mouquet. LE ROLE DE L'AUTOANTIGENE DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES : ETUDE DE LA DESMOGLEINE 1 AU COURS DES PEMPHIGUS. Immunologie. Université de Rouen, 2006. Français. NNT : . tel-00130209

HAL Id: tel-00130209

https://theses.hal.science/tel-00130209

Submitted on 9 Feb 2007

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE NORMANDE DE CHIMIE-BIOLOGIE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE ROUEN

Discipline : Sciences Biologiques

Spécialité : Immunologie

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'université de Rouen
par :

Mr MOUQUET Hugo

LE ROLE DE L'AUTOANTIGENE DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES : ETUDE DE LA DESMOGLEINE 1 AU COURS DES PEMPHIGUS

Soutenue publiquement le 21 novembre 2006 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur François TRON	Président
Monsieur le Professeur Christian BOITARD	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean François NICOLAS	Rapporteur
Monsieur le Professeur Pascal JOLY	Examinateur
Madame Danièle GILBERT	Directrice de thèse

Inserm
Unité 519
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITE DE ROUEN

IFRMP

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE NORMANDE DE CHIMIE-BIOLOGIE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE ROUEN

Discipline : Sciences Biologiques

Spécialité : Immunologie

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'université de Rouen
par :

Mr MOUQUET Hugo

LE ROLE DE L'AUTOANTIGENE DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES : ETUDE DE LA DESMOGLEINE 1 AU COURS DES PEMPHIGUS

Soutenue publiquement le 21 novembre 2006 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur François TRON	Président
Monsieur le Professeur Christian BOITARD	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean François NICOLAS	Rapporteur
Monsieur le Professeur Pascal JOLY	Examinateur
Madame Danièle GILBERT	Directrice de thèse

CHU
Hôpitaux de Rouen

REGION HAUTE NORMANDIE

« Science avec patience, le supplice est sûr »

A. Rimbaud, *Poésies*.

A Pauline,

A mes parents et mes sœurs,

A mes Amis,

A Monsieur le Professeur François TRON, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse, je tiens à exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueilli dans son équipe. Je tiens à vous témoigner ma sympathie et mon profond respect pour m'avoir encouragé et soutenu, pour m'avoir transmis vos connaissances immunologiques et enseigner les subtilités de la recherche, pour votre ouverture d'esprit qui m'a permis d'appréhender avec liberté ce travail de thèse. Soyez certain, Monsieur, que vos conseils et vos enseignements me guideront tout au long de mon parcours sur le chemin tortueux de la recherche et au cours de ma carrière en Immunologie qui je le souhaite, sera la plus longue et bénéfique possible.

A Madame Danièle GILBERT, directrice de thèse, qui a supervisé mon travail durant mon DEA et mes cinq années de thèse, j'adresse toute ma gratitude. Pour votre soutien et votre confiance à mon égard, pour l'autonomie dont j'ai disposé en travaillant à vos côtés ainsi que le sens de la rigueur et de la critique scientifique que j'ai développé sous votre direction, je vous remercie.

A Monsieur le Professeur Christian BOITARD et Monsieur le Professeur Jean-François NICOLAS, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Eu égard à leur renommée scientifique, leur participation à ce jury constitue pour moi un honneur. Qu'ils en soient remerciés.

A Monsieur le Professeur Pascal JOLY, j'adresse ma profonde reconnaissance pour son indispensable soutient financier durant mes deux dernières années de thèse qui m'a permis de finaliser celle-ci dans les meilleures conditions. Je tiens à vous exprimer, Monsieur, mes vifs remerciements pour avoir accepté d'être l'examinateur de mon travail, pour votre confiance et pour m'avoir associé à vos projets.

A Monsieur le Professeur Philippe MUSETTE, j'adresse mes remerciements chaleureux pour son soutient, ses encouragements et ses conseils avisés.

Au Docteur Philippe MARTEL, qui m'insuffla sa passion de la recherche sur les pemphigus et qui fut le guide de mes tout premiers pas dans ce domaine, je tiens à témoigner toute mon amitié.

A mon ami, le Docteur Damien PICARD, compère de labo inestimable, merci pour tout.

A tous les acteurs de la recherche à l'U519 qui ont participé à ma formation pratique et à l'élaboration de mon savoir-faire technique, Dr Vincent Saulot, Mr Laurent Drouot, Dr Sandrine Thébault, Mr Christophe Arnoult, Dr Roland Charlionnet. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens à remercier les techniciennes du laboratoire d'Immunopathologie Clinique tout particulièrement Mme Edwige Tesson, ainsi que Mlle Isabelle Duval.

ABBREVIATIONS

2D : bidimensionnel(le)

- A -

Ag : antigène(s)
Ac(m) : anticorps (monocloanaux)
ACh : acétylcholine
ADN(c) : acide désoxyribonucléique (complémentaire)
AIRE : *Autoimmune regulator*
APECED : *Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*
AutoAc : autoanticorps
AutoAg : autoantigène(s)
ARN(m) : acide ribonucléique (messager)

- B -

β2-GPI : β2-glycoprotéine I
BCR *: B Cell Receptor*
BET : Bromure d'éthidium
BPAG1 : antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse

- C -

CPA : cellules présentatrices d'antigènes
CDR : troisième région déterminant la complémentarité
CET(m) : cellules épithéliales thymiques (de la médullaire)
CHRNA : sous-unité α du récepteur musculaire à l'acétylcholine
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CTLA4 : *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*
Cp : *crossing point*

- D -

DP : desmoplakine(s)
Dsc : desmocolline(s)
Dsg : desmogléine(s)
DSG1-AT : transcrits alternatifs du gène *DSG1*
DTT : dithiotréitol

- E -

EAE : encéphalomyélite allergique expérimentale
EC : extracellulaire
ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
ENV : envoplakine

- F -

Foxp3 : *forkhead box P3*

- G -

GAPDH : gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GITR : *glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor like receptor*
GPI : gradient de pH immobilisé

- H -

HLA : *Human Leukocyte Antigen*
Hsp : *Heat shock protein*
HE : *Human Epidermis*

- I -

IEF : isoélectrofocalisation
IFD : immunofluorescence directe
IFI : immunofluorescence indirecte
Ig (IV): immunoglobulines (intraveineuses)
IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate

- L –

LED : lupus érythémateux disséminé

- M -

MAPK : *mitogen activating protein kinase*
MAI : maladies autoimmunes
MALDI-ToF : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*
M-MLV RT : *Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
MBP : protéine basique de la myéline
MOG : protéine oligodendriale de la myéline

- N -

NK : *Natural killer*
NOD : *Non Obese Diabetic*

- P -

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique
(Q-)PCR : *(Quantitative-)polymerase chain reaction*
PF : pemphigus foliacé
PG : plakoglobine
PKP : plakophiline(s)
pI : point isoélectrique
PL : plectine
PLP : protéine protéolipidique
PPL : périplakine
PPN : pemphigus paranéoplasique
PR : polyarthrite rhumatoïde
PS : pemphigus superficiels
PV : pemphigus vulgaire

- R -

RAG : *recombination-activating genes*
(sn)RNP : *(small nuclear) ribonucleoproteins*
rEC1/5-Dsg1 : région extracellulaire recombinante de la Dsg1

- S -

SAPL : syndrome des anti-phospholipides
SCID : *Severe Combined Immunodeficiency*
SDS-PAGE : SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)-*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
SEP : sclérose en plaques
SI : *stimulation index*
SIC : substance intercellulaire
SNP : *single nucleotide polymorphism*

- T -

TB : thyroglobuline bovine
TCR : *T Cell Receptor*
TGFβ : *transforming growth factor-β*
TLR : *Toll-like receptors*
TNF : *Tumor necrosis factor*
Th : T *helper*
TSH : *Thyroid Stimulating Hormone*

- V -

VNTR : *variable number of tandem repeats*

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Mécanismes de tolérance des lymphocytes T et B 5

Figure 2. Rôle de la protéine AIRE dans l'induction de la tolérance intrathymique 9

Figure 3. Exemples de mécanismes lésionnels autoanticorps dépendants..... 17

Figure 4. Epissage canonique et non canonique des transcrits immatures 38

Figure 5. Mécanismes d'épissage alternatif des autoantigènes..... 39

Figure 6. Mécanisme proposé pour expliquer le processus auto-immun médié par la PLP..... 41

Figure 7. Ultrastructure du desmosome 48

Figure 8. Organisation moléculaire du desmosome 49

Figure 9. Structure des cadhérines desmosomales 50

Figure 10. Représentation moléculaire de l'interface d'adhésion entre les domaines extracellulaires des cadhérines classiques 51

Figure 11. Organisation génomique des cadhérines desmosomales..... 53

Figure 12. Structures génique et protéique de la desmogléine 1 55

Figure 13. Structure des plakines..... 57

Figure 14. Organisation moléculaire de la jonction dermoépidermique 60

Figure 15. Lésions muqueuses et cutanées de pemphigus vulgaire..... 65

Figure 16. Histologie des pemphigus 66

Figure 17. Lésions cutanées de pemphigus foliacé 67

Figure 18. Tumeurs associées au pemphigus paranéoplasique..... 68

Figure 19. Les réactivités des autoanticorps chez les malades atteints de pemphigus 70

Figure 20. Corrélation entre les populations d'anticorps anti-desmogléines et les phénotypes clinico-histologiques de pemphigus 78

Figure 21. Modèles de pathogénicité des anticorps anti-desmogléines 83

Figure 22. Immunopharmacologie du pemphigus 91

Figure 23. Position des résidus polymorphiques de la chaîne β dans la poche d'ancrage des peptides de la molécule HLA-DR..... 98

Figure 24. Distribution génotypique du SNP 809 et de la combinaison DR4/SNP809 C/C chez les malades atteints de pemphigus foliacé et chez les sujets sains 100

Figure 25. Cartographie épitopique T des domaines extracellulaires de la desmogléine 3..... 103

Figure 26. La réponse T au cours du pemphigus vulgaire 104

Figure 27. Les pemphigus endémiques..... 107

Figure 28. Séquences nucléique et protéique de l'isoforme tronquée de la desmogléine 1 119

Figure 29. Principe de la PCR en temps réel sur l'appareil LightCycler 122

Figure 30. Représentation schématique des principales étapes de la production d'un baculovirus recombinant utilisé pour la synthèse de la protéine rEC1/5-Dsg1 126

Figure 31. Organigramme des étapes expérimentales de la production de la baculoprotéine recombinante 127

Figure 32. Séquence nucléique codant pour la région extracellulaire de la desmogléine 1 humaine 129

Figure 33. Structure de la « cassette » de clonage du vecteur pGEM4Z-SP-TAG..... 134

Figure 34. Organigramme des étapes expérimentales de la purification des baculovirus recombinants par la technique des plages de lyse..... 137

Figure 35. Structure du Transcend™ tRNA utilisé comme système de purification et de détection des protéines synthétisées par transcription/traduction *in vitro*..... 143

Figure 36. Représentation schématique des principales étapes de la production d'Ac polyclonaux anti-peptides de l'isoforme tronquée de la Dsg1 .. 144

Figure 37. Représentation schématique des principales étapes de l'identification de protéines cibles d'anticorps par immunocriblage de carte protéique 2D couplé à la spectrométrie de masse 150

Figure 38. Représentation schématique des principales étapes de l'identification de protéines cibles d'anticorps par immunocriblage de banque d'expression d'ADNc 156

Figure 39. Epissage alternatif à l'origine d'une isoforme tronquée de la Dsg1..... 160

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Autoantigènes exprimés dans le thymus et maladies auto-immunes associées 7

Tableau 2. Manifestations pathologiques du syndrome APECED 8

Tableau 3. Les principales maladies auto-immunes 14

Tableau 4. Diversité des autoantigènes au cours des maladies auto-immunes..... 15

Tableau 5. Mécanismes lésionnels des autoanticorps 16

Tableau 6. Modifications post-traductionnelles associées aux maladies auto-immunes..... 33

Tableau 7. Polymorphismes géniques d'autoantigènes et mécanismes associés 33

Tableau 8. Exemples d'autoantigènes subissant un épissage alternatif 37

Tableau 9. Modifications des autoantigènes induites par épissage alternatif..... 40

Tableau 10. Comparaison des séquences aminoacides entre les desmogléines humaines..... 54

Tableau 11. Partenaires desmosomiaux d'interactions avec les protéines *Armadillo* 62

Tableau 12. Associations entre pemphigus et d'autres maladies auto-immunes..... 69

Tableau 13. Autoantigènes des pemphigus 73

Tableau 14. Allèles HLA de susceptibilité au pemphigus vulgaire 94

Tableau 15. Allèles HLA de susceptibilité au pemphigus superficiel 94

Tableau 16. Séquences des amorces utilisées pour la l'amplification des séquences ADNc spécifiques des transcrits *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT..... 120

Tableau 17. Composition du mélange réactionnel de PCR pour l'amplification des séquences ADNc spécifiques des transcrits *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT 120

Tableau 18. Phases de la réaction de PCR classique pour l'amplification des séquences ADNc spécifiques des transcrits *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT 120

Tableau 19. Composition du milieu réactionnel des réactions de Q-PCR en temps réel sur LightCycler™ pour l'amplification des ADNc *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT..... 123

Tableau 20. Phases de la réaction de Q-PCR en temps réel sur LightCycler™ pour l'amplification des ADNc *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT 124

Tableau 21. Composition du milieu réactionnel de PCR « nichée » pour l'amplification des séquences ADNc codant pour le peptide signal et le propeptide de la Dsg1 humaine..... 128

Tableau 22. Phases de l'amplification par PCR « nichée » des séquences ADNc codant pour le peptide signal et le propeptide de la Dsg1 humaine 128

Tableau 23. Composition du mélange réactionnel de la double digestion par les enzymes de restriction BamHI et Hind III..... 130

Tableau 24. Composition du mélange réactionnel de la PCR utilisant les amorces M13 131

Tableau 25. Phases de la réaction de PCR utilisant les amorces M13 131

Tableau 26. Composition du mélange réactionnel de séquençage sur le séquenceur 16 capillaires AB3100 (Applied Biosystems)..... 132

Tableau 27. Phases de la réaction de séquençage sur le séquenceur 16 capillaires AB3100 (Applied Biosystems)..... 132

Tableau 28. Conditions expérimentales de la ligation entre le vecteur pGEM4Z-SP et les séquences codant les peptides FLAG et Histidine 133

Tableau 29. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification par PCR de la séquence ADNc codant pour la région extracellulaire de la Dsg1..... 135

Tableau 30. Phases de la réaction de PCR pour l'amplification de la séquence ADNc codant pour la région extracellulaire de la Dsg1 135

Tableau 31. Mélange réactionnel de la digestion par l'enzyme Pfl23 II..... 135

Tableau 32. Composition du mélange réactionnel de la double digestion du vecteur de transfert p119. 136

Tableau 33. Composition du gel de polyacrylamide de porosité 14% utilisé pour la séparation électrophorètique des protéines par SDS-PAGE... 138

Tableau 34. Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification de la séquence ADNc codant pour la protéine EC1/2-INT6 140

Tableau 35. Phases de l'amplification par PCR de la séquence ADNc codant pour la protéine EC1/2-INT6 140

Tableau 36. Composition du mélange réactionnel de la PCR utilisant les amorces SP6 et T7 141

Tableau 37. Phases de la réaction de PCR utilisant les amorces SP6 et T7 141

Tableau 38. Composition des solutions de réhydratation des bandelettes GPI..... 152

Tableau 39. Composition du mélange réactionnel de la PCR de criblage des clones de la banque λgt11 156

Tableau 40. Phases de la réaction de PCR de criblage des clones de la banque λgt11 157

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION 1

Chapitre 1 : Les Maladies Auto-immunes 3

I. LA TOLERANCE AU SOI 3

A- Evolution du concept de tolérance immunitaire 3

B- Les mécanismes de tolérance immunitaire 4

1/ LA TOLERANCE DES LYMPHOCYTES T 4

La tolérance centrale 4

Le concept d'expression thymique d'antigènes tissu-spécifiques 6

La tolérance périphérique 10

2/ LA TOLERANCE DES LYMPHOCYTES B 11

La tolérance centrale 11

La tolérance périphérique 12

II. PRESENTATION DES MALADIES AUTO-IMMUNES 13

A- Critères et classification 13

B- Les mécanismes lésionnels des effecteurs auto-immuns 16

1/ LES AUTOANTICORPS : DES FACTEURS LESIONNELS MAJEURS 16

2/ LES EFFECTEURS LYMPHOCYTAIRES T 19

C- Les modèles expérimentaux de maladies auto-immunes 20

1/ LES MODELES SPONTANNES 21

La souris NOD 21

Les souris lupiques 22

La thyroïdite du poulet obèse 23

2/ LES MODELES INDUITS 24

La thyroïdite allergique expérimentale 24

L'encéphalomyélite allergique expérimentale 25

Chapitre 2 : Le Rôle des Autoantigènes au cours des Maladies Auto-immunes 27

I. L'AUTOANTIGENE INITIE ET CONDUIT LA REPONSE AUTO-IMMUNE 27

II. LA SEQUESTRATION DES AUTOANTIGENES 28

A- La séquestration anatomique 28

B- La séquestration moléculaire 28

III. LES MODIFICATIONS DES ANTIGENES DU SOI 29

A- Modifications de l'autoantigène par les métaux lourds 30

B- Modifications de l'autoantigène et processus apoptotique 30

C- Modifications de l'autoantigène et cancer 31

D- Modifications de l'autoantigène au cours des processus de réparation tissulaire 32

E- Modifications co- et post-traductionnelles des autoantigènes 32

IV. LE POLYMORPHISME GENIQUE DES AUTOANTIGENES 33

A- Le modèle de la myasthénie 34

B- Le modèle du diabète de type 1 34

C- Autres polymorphismes géniques des autoantigènes 36

V. EPISSAGE ALTERNATIF ET ISOFORMES D'AUTOANTIGENES 36

A- L'épissage alternatif des transcrits codant des autoantigènes est fréquent 38

B- Des isoformes d'autoantigènes à l'origine d'une rupture de la tolérance centrale ? 41

C- La réponse auto-immune dirigée contre les isoformes d'autoantigènes générées par épissage alternatif 44

1/ UNE REPONSE LYMPHOCYTAIRE T DIRIGEE CONTRE DES EPITOPES SPECIFIQUES D'ISOFORMES D'AUTOANTIGENES : L'EXEMPLE DE LA MBP 44

2/ LA REACTIVITE AUTOANTICORPS CONTRE LES ISOFORMES D'AUTOANTIGENES 45

Chapitre 3 : Le Desmosome 48

I. L'ULTRASTRUCTURE DU DESMOSOME 48

II. LA STRUCTURE MOLECULAIRE DU DESMOSOME 49

A- Les cadhérines desmosomales 50

1/ LA STRUCTURE MOLECULAIRE 50

2/ LA FONCTION D'ADHESION 52

3/ L'EXPRESSION TISSULAIRE 53

4/ LES DIFFERENTS MEMBRES 54

Les desmogléines 54

Les desmocollines 56

B- Les plakines 56

1/ LA STRUCTURE MOLECULAIRE 57

2/ LA FONCTION D'ANCRAGE 57

3/ LES DIFFERENTS MEMBRES 57

Les desmoplakines 57

La plectine 59

L'antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse, BPAG1 59

L'envoplakine et la périplakine 60

L'épiplakine 61

C- Les protéines *Armadillo* 61

La plakoglobine 62

Les plakophilines 62

Chapitre 4 : Les Pemphigus 64

I. LES ASPECTS CLINIQUES ET HISTOLOGIQUES DES DIFFERENTES FORMES DE PEMPHIGUS 64

A- Le pemphigus vulgaire, l'archétype des pemphigus profonds 64

B- Le pemphigus foliacé, l'archétype des pemphigus superficiels 66

C- Le pemphigus paranéoplasique 67

D- Les associations au pemphigus 68

1/ LES NEOPLASIES 68

2/ LES MALADIES AUTO-IMMUNES 69

II. LES SPECIFICITES DES AUTOANTICORPS AU COURS DES PEMPHIGUS 70

A- Les anticorps déposés et circulants 70

B- Localisation et identification des antigènes cibles 71

1/ LE PEMPHIGUS VULGAIRE 71

2/ LE PEMPHIGUS FOLIACE 72

3/ LE PEMPHIGUS PARANEOPLASIQUE 72

C- Les anticorps anti-desmogléines 74

D- Les anticorps anti-plakines 75

E- Le chevauchement de la réponse autoanticorps au cours des pemphigus : Conséquence d'un phénomène d'extension épitopique ? 76

F- Les anticorps anti-récepteurs à l'acétylcholine 79

III. LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PEMPHIGUS 80

A- La pathogénicité des autoanticorps 80

1/ PREUVES INDIRECTES 80

Relation entre l'activité de la maladie et le taux d'anticorps circulants 80
Pemphigus néonatal 81
2/ MODELES EXPERIMENTAUX 82
Modèles d'acantholyse *in vitro* 82
Modèles d'acantholyse *in vivo* 82
Modèle murin de pemphigus vulgaire 84
B- Les mécanismes physiopathologiques 85
1/ INHIBITION DE LA FONCTION D'ADHESION DES DESMOGLEINES 86
2/ TRANSDUCTION DE SIGNAUX CELLULAIRES 87
Activation de protéases 87
Phosphorylation des protéines desmosomales et désorganisation du desmosome 88
Les récepteurs à l'acétylcholine et l'immunopharmacologie du pemphigus 90
3/ APOPTOSE KERATINOCYTAIRE 92
IV. GENETIQUE DES PEMPHIGUS 93
A- L'association au *locus* HLA 93
B- Le polymorphisme génique des desmogléines 99
C- Autres gènes candidats 101
V. LA REPONSE LYMPHOCYTAIRE T AU COURS DES PEMPHIGUS 102
VI. LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET EXOGENES DU PEMPHIGUS 106
A- L'épidémiologie des pemphigus endémiques 106
1/ LE FOGO SELVAGEM 106
2/ LE PEMPGIGUS TUNISIEN 109
3/ LE PEMPHIGUS COLOMBIEN 109
B- Les facteurs exogènes 110
1/ LES PEMPHIGUS MEDICAMENTEUX 110
2/ LES RADIATIONS, LES FACTEURS DE CONTACT, LES VIRUS ET LES ALIMENTS 110
VII. LES TRAITEMENTS DES PEMPHIGUS 111

OBJECTIFS DE THESE 114

MATERIELS & METHODES 116
A- Les patients 117
1/ DIAGNOSTIC 117
2/ LE GENOTYPAGE HLA DE CLASSE II 117
B- La quantification des transcrits normaux et alternatifs de la desmogléine 1 dans l'épiderme humain 117
1/ SOURCE TISSULAIRE 117
2/ EXTRACTION DES ARN ET TRANSCRIPTION INVERSE 118
3/ AMPLIFICATION DES SEQUENCES ADNc SPECIFIQUES DES TRANSCRIPTS NORMAUX ET ALTERNATIFS DE LA DESMOGLEINE 1 118
4/ QUANTIFICATION DES TRANSCRITS NORMAUX ET ALTERNATIFS DE LA DESMOGLEINE 1 PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL 121
Principe de la PCR en temps réel sur l'appareil LightCycler™ 121
Amplification des séquences ADNc d'intérêt par Q-PCR en temps réel 123
Normalisation et quantification des transcrits normaux et alternatifs de la desmogléine 1 124
C- Production des desmogléines 1 recombinantes 126
1/ PRODUCTION DE LA PROTEINE REC1/5-DSG1 126
Préparation du vecteur « cassette » de clonage 128
Clonage de la région extracellulaire de la desmogléine 1 134
Préparation du vecteur de transfert 136
Cotransfection des cellules d'insectes et production du virus recombinant 136
Production et purification de la protéine rEC1/5-Dsg1 139
2/ SYNTHESE DE LA FORME TRONQUEE DE LA DESMOGLEINE 1 139

Amplification de l'ADNc codant pour la protéine EC1/2-INT6 139
Clonage de l'insert codant pour la protéine EC1/2-INT6 140
Synthèse *in vitro* de la protéine EC1/2-INT6 142
D- La production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-desmogléine 1 et d'anticorps polyclonaux dirigés contre son isoforme tronquée 143
1/ COUPLAGE DES PEPTIDES A LA THYROGLOBULINE BOVINE 145
2/ IMMUNISATION DES ANIMAUX 145
3/ DETECTION DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES CHEZ LES ANIMAUX IMMUNISE 146
ELISA peptides 146
ELISA rEC1/5-Dsg1 146
Immunofluorescence indirecte 147
Immunoempreinte sur extrait protéique d'épiderme humain 147
4/ PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX 148
Génération des hybridomes 148
Clonage des hybridomes 149
E- L'identification des protéines épidermiques cibles par immunocriblage 149
1/ IMMUNOCRIBLAGE DE CARTE PROTEIQUE 2D D'EPIDERME HUMAIN 149
Préparation d'un extrait protéique d'épiderme humain 149
Réhydratation des bandelettes GPI 151
Première dimension : Isoélectrofocalisation des protéines 151
Equilibrage des bandelettes GPI 152
Deuxième dimension : Séparation des protéines par SDS-PAGE 152
Coloration des protéines de la carte 2D 153
Identification des protéines 153
2/ IMMUNOCRIBLAGE DE BANQUE D'EXPRESSION D'ADNc DE KERATINOCYTES HUMAINS 155
F- L'étude fonctionnelle de peptides spécifiques de l'isoforme tronquée de la desmogléine 1 157
1/ CAPACITE DE LIAISON DES PEPTIDES AUX MOLECULES HLA DE CLASSE II 157
2/ PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE 158

RESULTATS 159
A- Un épitope T spécifique d'une isoforme tronquée de la desmogléine 1, générée par épissage alternatif, se fixe à la molécule HLA DRβ1*0102 de susceptibilité au pemphigus superficiel 160
ARTICLE 1 163
B- L'immunisation de souris normales avec la desmogléine 1 induit une diversification de réponse anticorps vis à vis d'autres composants du desmosome 164
ARTICLE 2 166
C- Le transcrit de la desmogléine 1 est exprimé dans le thymus humain 167
ARTICLE 3 168

DISCUSSION 170

CONCLUSION 187

REFERENCES 188

ANNEXES 206

AVANT-PROPOS

Les pemphigus sont des maladies rares, dites orphelines dont l'incidence dans la population mondiale est faible. A titre d'exemple, l'incidence du pemphigus vulgaire (le plus fréquent) en Amérique du Nord et en Europe est de 1 à 3 nouveaux cas par million d'habitants et par an. Les pemphigus sont des maladies graves associées à une mortalité d'environ 30% pour le pemphigus vulgaire, à une importante altération des conditions de vie, à la fois en terme de souffrances physique et mentale, et posent donc de réels problèmes de santé publique.

Les pemphigus et plus généralement les maladies auto-immunes cutanées bulleuses, représentent un véritable paradigme de maladies auto-immunes spécifiques d'organe médiées par des autoanticorps pathogènes. Elles constituent donc un modèle d'étude des mécanismes d'auto-immunité d'autant plus que les antigènes cibles sont désormais connus et accessibles. En effet, depuis plus d'une vingtaine d'années, les efforts de recherche ont permis la localisation puis l'identification des autoantigènes cibles de la réponse auto-immune. L'étude des propriétés des autoanticorps, notamment leur rôle dans le processus physiopathologique, ainsi que la caractérisation de la réponse immune au niveau cellulaire ont largement contribué au développement de nouveaux outils diagnostiques, à une meilleure compréhension des processus d'auto-immunisation et à de nouvelles approches thérapeutiques.

En nous appuyant sur le concept bien établi du rôle initiateur de l'autoantigène au cours des maladies auto-immunes, nous avons entrepris d'étudier l'intervention d'un des autoantigènes des pemphigus, la desmogléine 1. Cette protéine est particulièrement intéressante puisque qu'elle est la cible de la réponse auto-immune au cours des différentes formes de pemphigus et par conséquent, semble jouer un rôle clé dans la maladie.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le système immunitaire désigne un ensemble de facteurs cellulaires et humoraux ayant pour but de protéger l'organisme des agressions provenant d'agents exogènes (bactéries, virus, parasites) ou endogènes (cellules tumorales) reconnus comme n'appartenant pas au « soi ». Les principales cellules du système immunitaire jouant un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie sont les lymphocytes T et B capables de reconnaître l'antigène (Ag) *via* leur récepteur pour l'Ag : TCR (*T Cell Receptor*) pour les cellules T et BCR (*B Cell Receptor*) pour les cellules B. La reconnaissance de l'Ag par le TCR nécessite, en outre, que celui-ci soit présenté par une molécule HLA (*Human Leukocyte Antigen*) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les récepteurs pour l'Ag sont spécifiques d'un Ag donné et l'ensemble des spécificités exprimées par les lymphocytes en constitue le répertoire. Ce répertoire résulte d'un processus génétique d'origine somatique. Il est théoriquement illimité et généré de façon stochastique avant tout contact préalable avec l'Ag par des mécanismes de recombinaison génétique. La génération de cette diversité est nécessaire à la défense de l'organisme. Elle constitue un avantage sélectif. Néanmoins, le système immunitaire est susceptible de générer des clones T et B capables de reconnaître des Ag du soi encore appelés clones autoréactifs. Ce sont les phénomènes dits de tolérance immunitaire qui permettent de prévenir la survenue de processus auto-immuns grâce à l'élimination ou au contrôle de ces clones autoréactifs. Dans certaines conditions non physiologiques, une dérégulation du réseau d'interactions cellulaires et moléculaires contrôlant la présence ou l'expansion de cellules autoréactives peut conduire à une rupture de tolérance au soi caractérisée par l'activation et la multiplication de ces cellules et au développement d'une maladie auto-immune (MAI). Les pemphigus représentent un groupe de MAI spécifiques d'organe qui touchent la peau et les muqueuses. Ils sont caractérisés par la production d'autoanticorps pathogènes dirigés contre des protéines du desmosome, plus particulièrement, les desmogléines qui permettent l'adhésion entre eux des kératinocytes de l'épiderme.

Ce propos introductif débutera par une description des divers aspects des MAI comportant notamment, un bref rappel des mécanismes de tolérance aux Ag du soi, des mécanismes effecteurs de la réponse auto-immune et des modèles expérimentaux d'étude de ces pathologies. Ces thèmes seront présentés en insistant sur leur relation avec l'autoantigène (autoAg). Dans un second temps, nous exposerons plus précisément les différents arguments en faveur du rôle de l'autoAg dans les processus d'auto-immunité. Enfin, après une synthèse sur la structure d'adhésion du desmosome, nous décrirons les caractéristiques immunologiques des pemphigus.

Chapitre 1 : Les Maladies Auto-immunes

I. LA TOLERANCE AU SOI

A- Evolution du concept de tolérance immunitaire

Au début du siècle dernier, Paul Ehrlich a observé le phénomène d'alloimmunisation dûe à la présence d'isolysines (isoanticorps) par injection à des chèvres de globules rouges homologues, tandis que toutes les tentatives d'auto-immunisation afin de produire des autolysines (autoanticorps) ont échoué. Ces observations montrant l'absence de réaction du système immunitaire vis à vis des propres constituants de l'organisme ont conduit Ehrlich à la notion d' *horror autotoxicus* pour désigner l'incapacité de celui-ci à se mettre en danger par la production d'autoanticorps (autoAc) toxiques. Ce postulat a été confirmé par la découverte des règles de compatibilité transfusionnelle par Karl Landsteiner qui lui ont permit de définir le système ABO en démontrant l'existence d'isoagglutinines naturelles dirigées contre l'Ag non exprimé et l'absence d'autoAc contre l'Ag exprimé. Les expériences conduites par Owen en 1945 suivies par celles de Medawar ont eu une influence considérable dans l'élaboration de la théorie de la délétion clonale par le groupe de McFarlane Burnet. L'interprétation de Burnet et Medawar, a été que l'organisme doit acquérir la capacité de discriminer le soi du non soi pendant la vie embryonnaire et que les clones autoréactifs sont éliminés pendant la vie fœtale. Cette interprétation a permis de forger le concept de tolérance immunitaire.

La théorie originelle de la distinction entre soi et non soi s'est ultérieurement modifiée pour s'accommoder des nouvelles découvertes, incompatibles avec ce modèle soi/non soi, telles que : la génération à partir de lymphocytes B activés de potentielles cellules autoréactives *via* le phénomène d'hypermutation ; la nécessité pour le lymphocyte T de recevoir en plus du signal procuré par l'interaction TCR/peptide/CMH, un second signal apporté par des cellules présentatrices d'Ag (CPA) exprimant les molécules dites de costimulation ; ou encore la théorie du Danger défendue par Polly Matzinger qui stipule que la CPA pour fournir ce second signal doit elle-même recevoir un signal endogène « d'alarme » ou « de danger » provenant d'une cellule lésée ou soumise à un stress [Matzinger, 2002]. Il paraît clair aujourd'hui, que la tolérance immunitaire correspond d'avantage à un état physiologique acquis où le système immunitaire ne réagit pas de façon agressive contre les composants de l'organisme dans lequel il s'est développé, plutôt qu'à un état de non réponse contre les constituants du soi. La tolérance désigne donc l'ensemble des mécanismes inhibant ou contrôlant une réponse dirigée contre un Ag du soi ou autoAg.

B- Les mécanismes de tolérance immunitaire [Goodnow, 2005]

Les récepteurs pour l'Ag des lymphocytes T et B sont générés au hasard par le processus de recombinaison des différents segments géniques V, D et J codant pour les domaines variables de ces molécules. Entre 20 et 50% des TCR et des BCR ont une affinité potentiellement dangereuse pour les Ag du soi. Par ailleurs, des clones B autoréactifs peuvent aussi être générés par hypermutation somatique lors de leur différenciation dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes périphériques. L'élimination des clones autoréactifs implique donc des mécanismes de tolérance immunitaire intéressant aussi bien le compartiment T que le compartiment B. Dans de nombreux modèles de souris transgéniques exprimant sur la majorité de leurs lymphocytes un seul récepteur (TCR ou BCR), spécifique d'un Ag donné, le suivi du développement de ces lymphocytes a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes de tolérance souvent communs aux lymphocytes T et B. Classiquement, les mécanismes de tolérance lymphocytaire se scindent selon leur localisation anatomique en deux grandes catégories : l'une centrale, survenant dans les organes lymphoïdes centraux (thymus pour les cellules T et moelle osseuse pour les cellules B) et l'autre périphérique, prenant place dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, système lymphoïde associé aux muqueuses). La tolérance peut être acquise selon quatre mécanismes (Figure 1) : (i) l'élimination des cellules autoréactives par délétion clonale qui intervient dans les organes lymphoïdes centraux précocement au cours de leur différenciation ; (ii) la neutralisation fonctionnelle des cellules autoréactives appelée anergie clonale, qui se traduit par l'inaptitude des cellules à répondre à une stimulation par l'Ag ; (iii) la ré-édition du récepteur qui permet la génération de nouveaux récepteurs ayant perdu leur autoréactivité ; (iv) la régulation extrinsèque des cellules T appellée indifférence ou ignorance lymphocytaire (v) l'immunorégulation des cellules autoréactives par des cellules régulatrices à activité suppressive ou par d'autres facteurs tels que des facteurs de croissance ou des médiateurs pro-inflammatoires.

1/ LA TOLERANCE DES LYMPHOCYTES T

La tolérance centrale

Le répertoire lymphocytaire T exprimé en périphérie résulte des mécanismes de sélection positive et sélection négative qui ont lieu dans le thymus. La sélection positive est un processus destiné à favoriser la survie et l'expansion des thymocytes qui reconnaissent les peptides du soi complexés aux molécules du CMH exprimées par les cellules épithéliales de la corticale thymique. La sélection négative a pour but d'éliminer les cellules fortement réactives vis à vis des peptides du soi présentés par les molécules

du CMH qui sont exprimées par les cellules épithéliales de la médullaire thymique et les cellules dendritiques.

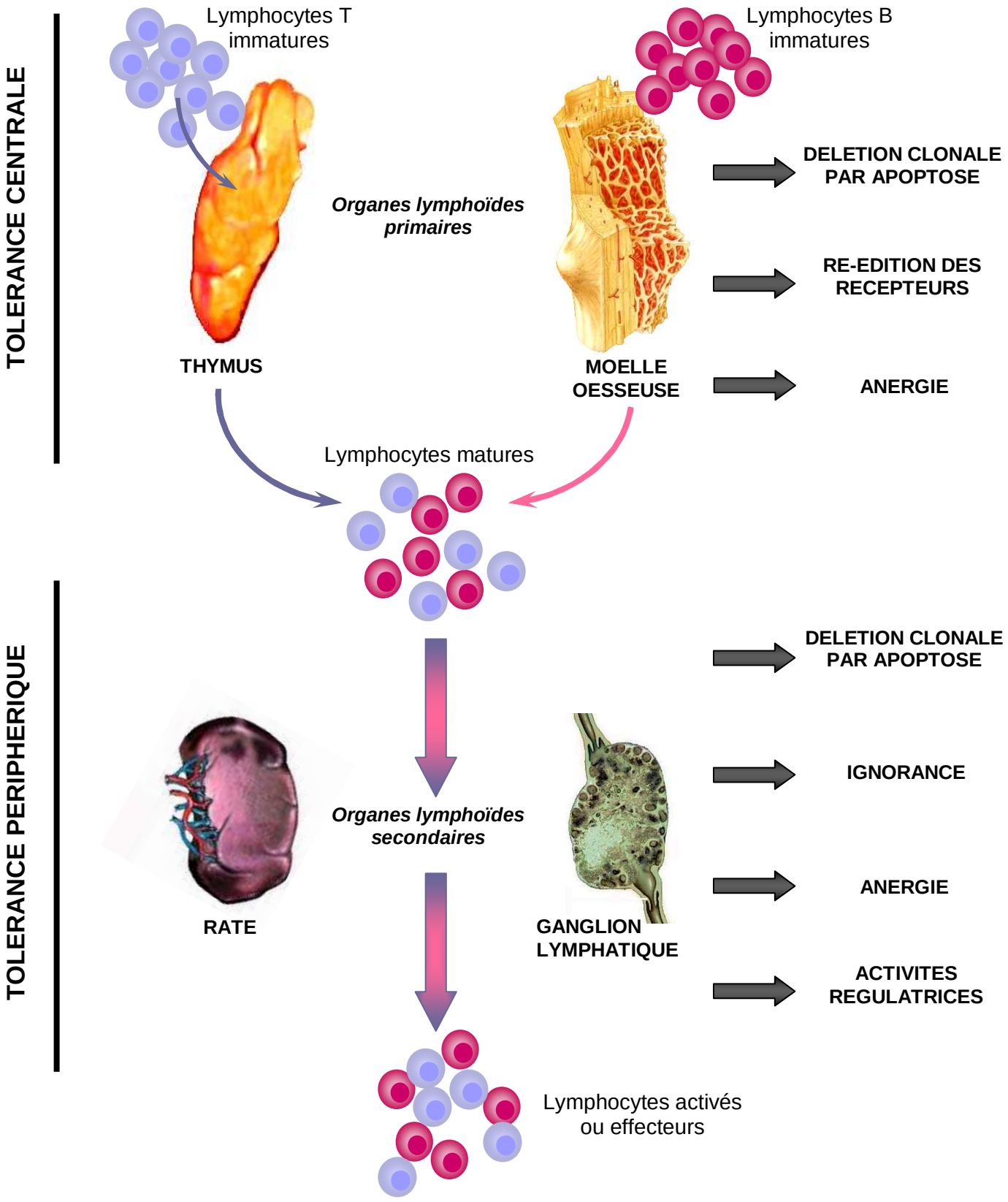


Figure 1. Mécanismes de tolérance des lymphocytes T et B.

Les cellules soumises à la sélection négative ou échappant à la sélection positive meurent rapidement par apoptose. Bien que les événements moléculaires impliqués dans ce phénomène soient encore mal connus, la signalisation de la mort cellulaire *via* les molécules pro-apoptotiques *BCL-2-interacting mediator of cell death* (BIM) et Fas semble cruciale. La délétion clonale des lymphocytes T autoréactifs est une étape essentielle dans les processus de tolérance immune qui se traduit par l'élimination de 90% des thymocytes entrant en différenciation.

Les thymocytes en voie de différenciation ont aussi la possibilité d'effectuer, nous l'avons vu plus haut, une ré-édition de leur TCR ayant une forte affinité pour un Ag du soi. Dans ce cas, l'expression du TCR est diminuée et grâce aux recombinases RAG (*recombination-activating gene*) qui permettent le réarrangement des *locus* codant pour les chaînes α et β, la première chaîne α synthétisée est remplacée par une seconde chaîne. Ce second mécanisme de tolérance centrale permet donc *in fine*, la perte de la spécificité anti-soi [McGargill, 2000].

Un dernier mécanisme de tolérance prenant place dans le thymus est l'anergie selon lequel l'interaction du TCR avec le complexe peptide/CMH conduit à l'inactivation intrinsèque du lymphocyte T. L'anergie lymphocytaire sera davantage détaillée dans la partie consacrée aux mécanismes de tolérance périphérique.

Le thymus intervient dans les processus de tolérance T non seulement par la délétion et l'anergie des cellules T autoréactives, mais aussi par la sélection positive des cellules T dites régulatrices CD4+CD25^{high}. Il est désormais clairement établi que ces cellules constituent une lignée distincte de cellules T matures qui prend son origine au niveau du thymus et nécessite une interaction forte avec les cellules épithéliales thymiques exprimant un complexe peptide du soi/molécules CMH de classe II. Le thymus contribue ainsi aux mécanismes de tolérance périphérique *via* la génération de lymphocytes T régulateurs dont les caractéristiques seront abordées plus bas.

Le concept d'expression thymique d'antigènes tissu-spécifiques

La diversité des Ag du soi qui sont accessibles au répertoire T qui s'établit dans le thymus va déterminer l'étendue et la spécificité de la tolérance centrale. Différentes catégories de CPA, essentiellement les cellules épithéliales thymiques (CET) de la médullaire et de la corticale, les cellules dendritiques thymiques et les macrophages, chacune présentant un ensemble unique de peptides du soi, contribuent à la diversité des Ag exprimés dans le thymus. L'absence d'autoréactivité vis à vis de protéines exprimées spécifiquement dans un tissu était auparavant considérée comme la conséquence exclusive de mécanismes de tolérance périphérique. En effet, n'étant pas

représentés au niveau thymique, ces Ag tissu-spécifiques ne pouvaient intervenir dans la délétion des clones T autoréactifs. Depuis une décennie, les travaux démontrant l'expression thymique d'autoAg tissu-spécifiques chez l'homme, la souris ou le rat, se sont progressivement accumulés (Tableau 1) [Sospedra, 1998; Heath, 1998]. Récemment, les travaux de l'équipe de Klein [Derbinsky, 2001] ont révélé la diversité des protéines des tissus qui sont représentées dans le thymus humain. On estime qu'environ 5 à 10% des protéines du soi sont présentes au niveau du thymus. Ce concept est dénommé *promiscous gene expression*. Cette expression de gènes tissu-spécifiques est une propriété physiologique des CET, en particulier des CET de la médullaire (CETm) et persiste aussi longtemps que des cellules T émigrent du thymus, même après l'involution thymique [Derbinsky, 2001]. Ce phénomène est conservé chez l'homme et la souris. De manière intéressante, certains des gènes tissulaires exprimés par les CETm sont regroupés sur des segments chromosomiques [Gotter, 2004].

Tableau 1. Autoantigènes exprimés dans le thymus et maladies auto-immunes associées [Kyewsky B, 2004]

Maladies auto-immunes	Autoantigènes candidats
Maladie d'Addison	Cyp11a1*
Gastrite auto-immune	H+/K+-ATPase (chaîne α et β*) et facteur intrinsèque*
Uvéite auto-immune	IRBP, Antigène rétinien S, α1-cristalline*
Thyroïdite de Hashimoto	Thyroglobuline, TPO
Infertilité masculine	Antigène 6 associé au sperme, glutathion transférase
Sclérose en plaque	PLP, (golli)-MBP, MOG et S100b*
Myasthénie	NAChR (chaîne α1)
Polyarthrite rhumatoïde	Collagène de type II
Diabète de type I	Insuline, GAD65, GAD67 et IA-2
Vitiligo	Tyrosinase, gp100 et MART1
APECED	Nombreux autoAg
Pemphigus vulgaire	Desmogléine 3

*L'expression thymique de ces autoAg n'a été détectée que chez la souris. Cyp11a1, cytochrome P450 11a1; IRBP, protéine de fixation à l'interphotorécepteur rétinoïde; TPO, thyropéroxydase; PLP, protéine protéolipidique; MBP, protéine basique de la myéline; MOG, glycoprotéine olygodendrocyte de la myéline; NAChR, récepteur nicotinique à l'acétylcholine; GAD, glutamate décarboxylase ; MART, antigène du mélanome reconnu par les cellules T.

La base moléculaire de ce phénomène a été découverte par l'équipe de Mathis et Benoist [Anderson, 2002] grâce à la caractérisation de souris invalidées pour le gène *AIRE*. Le gène *AIRE* (*Auto-immune regulator*), initialement identifié chez l'homme [The Finnish-German APECED Consortium, 1997 ; Nagamine, 1997], code pour un facteur de transcription fortement exprimé dans le thymus, notamment par les CETm. Chez l'homme, les mutations de ce gène (une cinquantaine a été identifiée) conduisent à une maladie héréditaire monogénique définie comme le syndrome poly-endocrinien auto-immun de type 1, le syndrome APS-1 (*Auto-immune Polyendocrinopathy Syndrome type 1*) ou APECED (*Auto-immune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*). L'APECED est caractérisé par un ensemble de manifestations pathologiques notamment auto-immunes touchant particulièrement les organes endocriniens (Tableau 2) et par la production d'autoAc dirigés contre les composants des organes affectés [Peterson, 2005].

Tableau 2. Manifestations pathologiques du syndrome APECED [Peterson P, 2005]

Composants de l'APECED	**Prévalence** (%)
Maladie d'Addison	60-100
Hypoparathyroïdisme	77-100
Candidose chronique	73-100
Dystrophie ectodermale	10-77
Thyroïdite auto-immune	8-18
Diabète de type 1	4-23
Hypogonadisme	31-60
Alopécie	27-72
Vitiligo	4-26
Kératopathie	12-35
Hépatite auto-immune	10-19
Anémie pernicieuse	12-15
Gastrite auto-immune	6

Les souris *AIRE*$^{-/-}$ présentent des manifestations auto-immunes proches de celles observées au cours du syndrome APECED, avec une infiltration lymphocytaire des organes cibles associée à la présence d'autoAc. L'analyse comparative du transcriptome des cellules thymiques des souris *AIRE*$^{-/-}$ et des souris normales a montré que la protéine AIRE induit l'expression dans les CETm, de 200 à 1200 transcrits dont la majorité ont une expression restreinte à un seul tissu. Beaucoup de ces gènes codent pour des autoAg qui sont la cible des réponses au cours de MAI, tels que la pro-insuline ou le cytochrome P450 1A2 [Anderson, 2002]. AIRE exerce sa fonction de tolérisation en permettant la sélection négative des cellules T autoréactives plutôt que la sélection de lymphocytes T

régulateurs que l'on sait aujourd'hui générés dans le thymus. En outre, AIRE semble capable d'augmenter les propriétés de CPA des CETm [Anderson, 2005a]. Par sa fonction d'induction de l'expression d'Ag tissu-spécifiques dans le thymus, AIRE a donc un rôle crucial dans l'acquisition de la tolérance des lymphocytes T (Figure 2). Il est cependant nécessaire d'apporter quelques nuances. En effet, de nombreux gènes tissu-restreints sont exprimés dans les CETm matures en l'absence de AIRE qui ne constitue vraisemblablement pas l'inducteur exclusif de cette *promiscous gene expression* [Derbinsky, 2005]. Par ailleurs, l'expression ectopique d'Ag tissulaires dans le thymus au niveau transcriptionnel n'est pas la condition *sine qua none* d'une délétion efficace des cellules T autoréactives vis à vis des peptides de cet Ag comme cela a pu être montré pour la H^+/K^+ ATPase, autoAg cible au cours de la gastrite auto-immune [Allen, 2005].

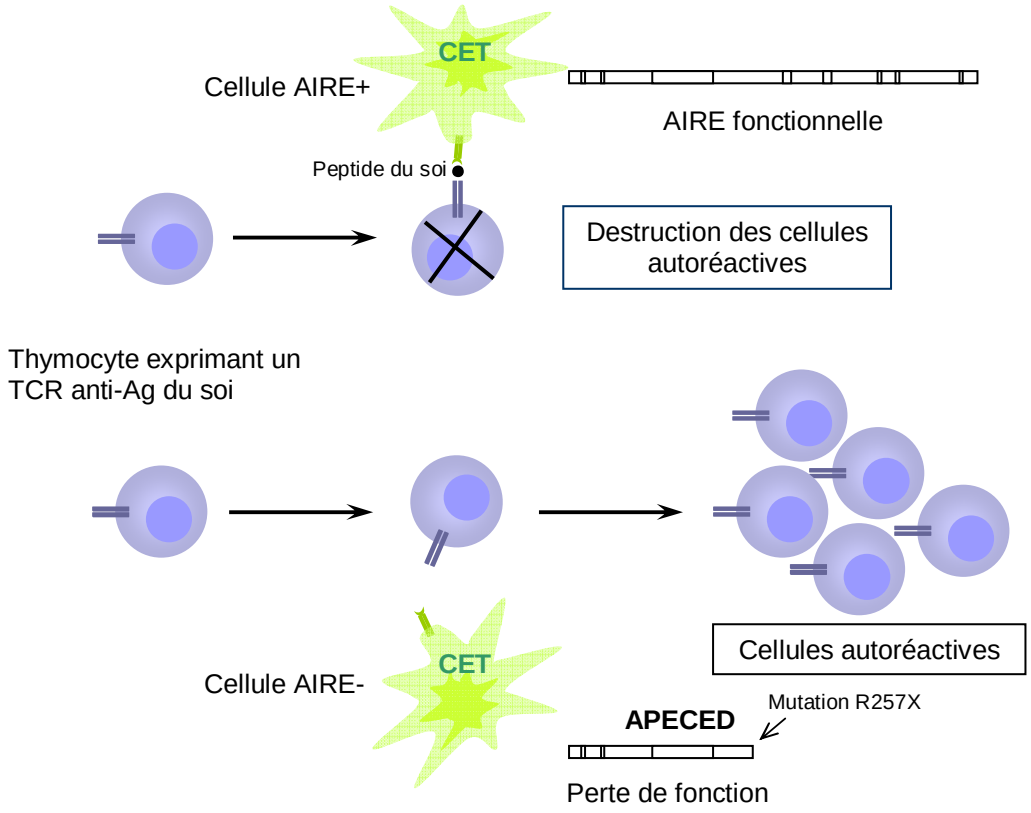


Figure 2. Rôle de la protéine AIRE dans l'induction de la tolérance intrathymique. Dans les conditions normales, AIRE est fonctionnelle et induit l'expression des Ag du soi par les cellules épithéliales thymiques (CET) permettant la délétion des cellules T autoréactives au cours du processus de sélection négative. Lorsque la protéine AIRE est défective chez l'homme au cours du syndrome APECED et chez les souris $AIRE^{-/-}$, les CET ne présentent plus les peptides du soi aux cellules T autoréactives. Ces cellules survivent, prolifèrent et initient une réponse auto-immune en périphérie, lors de la rencontre avec les autoAg cibles.

S'il est admis que les cellules T fortement autoréactives sont éliminées lors des événements de sélection intrathymique, de nombreuses études ont révélé le caractère partiel du phénomène de délétion clonale. En effet, tous les Ag tissu-spécifiques ne sont pas exprimés dans le thymus (Ag séquestrés). De plus, des modifications d'ordre quantitatif et qualitatif qui seront explicitées ultérieurement peuvent affecter l'expression thymique d'autoAg. Enfin, certaines modifications physiologiques (dégradation métabolique, spermatogenèse, lactation…) se traduisent par la synthèse *de novo* de molécules du soi qui nécessite une tolérisation des cellules T potentiellement autoréactives vis à vis de ces Ag. Des mécanismes tolérogènes doivent donc compléter à la périphérie, la purge des cellules T autoréactives amorcée au niveau central par les phénomènes de sélection intrathymique.

La tolérance périphérique

Les 4 mécanismes de tolérance périphérique qui peuvent s'exercer sur les lymphocytes T et B sont présentés dans la figure 1. L'anergie consiste en une altération fonctionnelle des cellules T autoréactives qui se traduit par une incapacité à être activées et à proliférer en réponse à une stimulation antigénique. Ce mécanisme de régulation intrinsèque des lymphocytes T peut résulter de modifications biochimiques diverses. Celles-ci consistent en la diminution de l'expression des TCR qui peut être de 50% et, l'augmentation du seuil d'activation de la cellule par recrutement, par exemple, de molécules impliquées dans le contrôle négatif de la voie de signalisation du TCR comme CD5 ou CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*). Ces molécules ont donc un rôle crucial dans le maintien de l'anergie périphérique de lymphocytes T autoréactifs.

Un autre modèle de tolérance périphérique est l'indifférence lymphocytaire. Il s'agit d'une régulation extrinsèque du lymphocyte T par limitation des *stimulus* immunogèniques. Parmi les *stimulus* immunogèniques susceptibles d'induire cette levée d'indifférence, l'interaction de la molécule CD28 exprimée par les cellules T avec les protéines B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) à la surface des APC a vraisemblablement un rôle majeur. De façon générale les APC, notamment les cellules dendritiques et leur activation par l'intermédiaire des récepteurs *Toll-like* (TLR), participent étroitement à l'activation des cellules T autoréactives et donc au contrôle de la tolérance T périphérique [Turley, 2002].

Un dernier mécanisme est l'immunorégulation, c'est-à-dire la suppression de clones T autoréactifs par d'autres populations lymphocytaires T. L'autoréactivité physiologique et, de façon plus générale, l'ensemble des réponses immunitaires sont placées sous le contrôle de plusieurs populations de cellules T régulatrices, appelées autrefois cellules T suppressives. Cette immunorégulation joue un rôle essentiel dans la tolérance périphérique comme l'illustre l'apparition d'un syndrome poly-auto-immun

après thymectomie chez la souris [Sakaguchi, 2004]. Le rôle de l'immunorégulation dans la tolérance périphérique est, cependant, complexe et encore mal défini, faisant intervenir à la fois des cellules régulatrices naturelles (cellules T CD4+CD25^{high} mais aussi cellules NKT et γ/δ^+) dont la présence n'est pas secondaire à des stimulations exogènes ou endogènes et des cellules régulatrices adaptatives (telles que les cellules Th2, CD4+CD62L$^+$ et Tr1) dont la différentiation est secondaire à la stimulation par un autoAg. Néanmoins, au vu des différentes avancées réalisées sur la compréhension des lymphocytes T régulateurs et de leur utilisation potentielle dans le traitement des MAI, il est intéressant d'en décliner quelques caractéristiques. Les expériences *in vitro* ont montré que les cellules T CD4+CD25^{high} sont capables d'inhiber la prolifération et les fonctions effectrices de lymphocytes T CD4+CD25$^-$. Bien que ces cellules régulatrices aient une spécificité pour l'autoAg, il n'est pas formellement établi que leur action suppressive soit spécifique de l'autoAg reconnu ou plus diffuse, en s'étendant à des réponses immunitaires spécifiques d'autres autoAg. En revanche, leur action suppressive semble nécessiter un contact direct avec les cellules cibles et n'apparaît pas dépendante de la sécrétion de cytokines. Toutefois, le rôle de l'IL10 et surtout du TGFβ (*transforming growth factor-β*) a été évoqué, de même que l'intervention de molécule membranaire notamment celle de la molécule CTLA4 et du GITR (*glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor like receptor*). Enfin, le facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box P3*) constituerait un marqueur spécifique des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25^{high} chez l'homme et la souris. Des mutations du gène *Foxp3*, situé sur le chromosome X, sont responsables chez l'homme de troubles dysimmunitaires complexes, tel que l'IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*). Les sujets atteints sont des enfants de sexe masculin qui présentent une sensibilité particulière aux maladies auto-immunes et allergiques. Chez la souris, les mutations du gène *Foxp3* sont à l'origine du phénotype dit *scurfy*. Les souris *scurfy* développent des pathologies analogues à celles de l'IPEX chez l'homme et présentent également une lymphoprolifération associée à une activation anormalement élevée des cellules T CD4+. L'étude de ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de Foxp3 dans l'orientation et le développement thymique des cellules T régulatrices CD4+CD25^{high} [Sakaguchi, 2004].

2/ LA TOLERANCE DES LYMPHOCYTES B

La tolérance centrale

Au niveau central, la sélection négative des lymphocytes B a lieu dans la moelle osseuse, au stade immature. Les analyses de souris transgéniques exprimant un répertoire de BCR restreint révèlent une série d'événements cellulaires qui sont déclenchés immédiatement après que des cellules B immatures arborent des récepteurs anti-Ag du soi dans la moelle osseuse. Lorsque l'affinité du BCR pour l'Ag et la

signalisation intracellulaire excèdent un certain seuil, les lymphocytes B internalisent rapidement leurs BCR et stoppent temporairement leur programme de maturation. Trois événements vont résulter de cet état: les récepteurs de « *homing* » tel que le ligand de CD62, nécessaires à l'entrée des cellules B dans les ganglions lymphatiques, ne sont pas exprimés; (ii) les récepteurs pour le *B-cell activating factor* (BAFF), une cytokine requise pour la survie des lymphocytes B, ne sont pas induits; (iii) les recombinases RAG-1 et RAG-2 sont exprimées. Les cellules B immatures exprimant un BCR anti-soi de forte affinité ont alors la possibilité de ré-éditer leur récepteur. Le réarrangement du *locus* codant pour la chaîne légère par les recombinases permet le remplacement de la première chaîne légère par une deuxième chaîne et, *in fine*, la perte de la spécificité anti-soi [Erikson, 1991 ; Nemazee, 2003]. Si leurs récepteurs autoréactifs n'ont pas été ré-édités, les cellules B meurent après 1 à 2 jours. Ce processus de délétion clonale implique l'induction du facteur pro-apoptotique BIM ainsi que la répression des récepteurs de la molécule BAFF.

Une anergie des clones lymphocytaires B dirigée contre l'Ag du soi peut également être induite au niveau de la moelle osseuse. Les lymphocytes B anergisés présentent alors une diminution, soit de l'expression du BCR, soit des signaux d'activation de la voie de signalisation positive du BCR. Le modèle murin double transgénique pour le lysozyme de poule et un anticorps (Ac) spécifique de haute affinité dirigé contre cette molécule a largement contribué à l'exploration du phénomène d'anergie clonale. Dans ce modèle, bien que des clones autoréactifs spécifiques du lysozyme soient présents, aucune réponse humorale spécifique n'est initiée par ces cellules B [Goodnow, 1988].

La tolérance périphérique

Au niveau périphérique, le lymphocyte B peut aussi manifester une indifférence vis à vis des autoAg. La prolifération et la différenciation des cellules B en plasmocytes nécessitent en effet que celles-ci reçoivent deux signaux, l'un de l'Ag se liant au BCR et l'autre des cellules T auxiliaires. Les lymphocytes T peuvent délivrer leur message par le ligand de CD40 exprimé à leur surface et la sécrétion de cytokines telles que l'IL2, l'IL4, l'IL5 et l'IL21. L'absence du deuxième signal, c'est-à-dire de cellules T spécifiques d'un des épitopes de l'Ag conduit à l'arrêt du programme de différenciation voire à la mort cellulaire du lymphocyte B [Goodnow, 2005]. Récemment, le rôle des TLR exprimés à la surface des cellules B a été démontré dans l'activation du lymphocyte B [Beutler, 2004] : ceux-ci pourraient se substituer partiellement aux signaux délivrés par les cellules T pour permettre la production d'Ac.

II. PRESENTATION DES MALADIES AUTO-IMMUNES

Les MAI représentent l'expression pathologique du phénomène d'auto-immunité. Il est légitime de penser que des défaillances au niveau des différents mécanismes d'induction de tolérance centrale et/ou périphérique conduisent à l'émergence de lymphocytes T et B autoréactifs et donc, à la possibilité de développer des manifestations auto-immunes. Cette rupture de la tolérance est par exemple parfaitement illustrée par le syndrome APECED chez l'homme et chez la souris invalidée pour le gène *AIRE*. Dans ce cas, un défaut constitutionnel unique dans l'expression thymique des autoAg et donc, dans le processus de sélection négative des clones T autoréactifs aboutit à l'induction d'un syndrome « multi-auto-immun ». Toutefois, la plupart des MAI sont des maladies multifactorielles qui résultent non pas d'un seul facteur génétique mais de l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux. Leur survenue n'est donc pas souvent la conséquence d'un mécanisme univoque.

A- Critères et classification

Les MAI sont fréquentes puisqu'elles affectent 5 à 7 % de la population [Sinha, 1990]. On en connaît plus de 40 et quasiment tous les organes peuvent être touchés. Quatre critères majeurs permettent d'affirmer l'origine auto-immune d'une maladie [Rose, 1993] : (i) la mise en évidence d'une réaction auto-immune (humorale ou cellulaire) dirigée contre l'organe à l'origine des manifestations cliniques ; (ii) la démonstration du pouvoir pathogène des effecteurs auto-immuns *in vitro* par des tests fonctionnels ou *in vivo* par des expériences de transfert ; (iii) l'induction d'une maladie expérimentale par immunisation avec l'autoAg cible ; (iv) la prévention ou la suppression de la maladie par l'administration d'un traitement immunosuppresseur. Peu de MAI réunissent l'ensemble de ces critères et dans de nombreux cas, seuls deux ou trois de ces critères sont réunis.

Il est d'usage de classer les MAI en deux catégories (Tableau 3) : (i) les MAI spécifiques d'organe, comme le diabète de type I, la myasthénie, les thyroïdites et les pemphigus, caractérisées par une réponse auto-immune dirigée contre des Ag exprimés spécifiquement par l'organe cible; (ii) les MAI non spécifiques d'organe ou systémique, caractérisées des manifestations pathologiques plus étendues, telles que le lupus érythémateux disséminé (LED) ou la polyarthrite rhumatoïde (PR), et dont la rupture de tolérance intéresse des autoAg ubiquitaires, exprimés par un grand nombre de tissus (Tableau 4). Ces maladies n'en demeurent pas moins Ag spécifique et peuvent paradoxalement s'exprimer préférentiellement au niveau d'un ou de plusieurs organes [Matsumoto, 1999].

Tableau 3. Les principales maladies auto-immunes

Maladies auto-immunes	
Non spécifiques d'organe	
Lupus érythémateux disséminé	
Polyarthrite rhumatoïde	
Syndrome de Gougerot-Sjögren	
Anémies hémolytiques, leucopénies et thrombopénies auto-immunes	
Sclérodermie	
Dermatomyosite, polymyosite	
Spécifiques d'organe	***Organe cible***
Thyroïdites	**GLANDES ENDOCRINES**
Maladie de Basedow	
Hypoparathyroïdie	
Maladie d'Addison	
Diabète de type 1	
Certains hypogonadismes	
Anémie de Biermer	**TRACTUS GASTRO-INTESTINAL**
Maladie de Crohn	
Myasthénie	**MUSCLE**
Rhumatisme articulaire aigu	
Syndrome de Lambert-Eaton	
Sclérose en plaques	**SYSTEME NERVEAUX**
Syndrome de Guillain-Barré	
Syndrome de Goodspature	**REIN**
Pemphigus	**PEAU**
Maladies bulleuses auto-immunes sous-épidermiques	
Vitiligo	
Pelade	
Psoriasis	
Hépatites aiguës	**FOIE**
Hépatites chroniques actives	
Cirrhose biliaire primitive	
Ophtalmies sympathiques	**OEIL**
Uvéites	
Certaines stérilités	**SPERMATOZOIDES**

Tableau 4. Diversité des autoantigènes au cours des maladies auto-immunes

Nature biochimique	Localisation tissulaire	Fonction	Maladies auto-immunes
Protéines			
Protéines structurales			
Histones	Ubiquitaire	Chromatine	Connectivites
Myosine	Muscle strié	Myofibrilles	Cardiomyopathies
Desmogléines	Peau/Muqueuses	Desmosomes	Pemphigus
Collagène IV	Rein	Membrane basale	Syndrome de Goodpasture
Protéines fonctionnelles			
Récepteur de la TSH	Thyroïde	Croissance des cellules thyroïdiennes	Maladie de Basedow
Récepteur de l'Ach	Muscles	Transmission du signal	Myasthénie
Facteur intrinsèque	Estomac	Transport vitamine B12	Anémie de Biermer
Immunoglobulines	Sang	Immunologique	Polyarthrite rhumatoïde
Hormones			
Insuline	Pancréas	Métabolisme du glucose	Diabète de type 1
Thyroglobuline	Thyroïde	Fonction thyroïdienne	Thyroïdite
Enzymes			
Pyruvate-déshydrogénase	Ubiquitaire	Mitochondries	Cirrhose biliaire primitive
H+/K+-ATPase	Estomac	Formation de HCl	Gastrites auto-immunes
Glutamate décarboxylase	Pancréas	Synthèse du GABA	Diabète de type 1
Calpastatine	Ubiquitaire	Inhibition des calpaïnes	Polyarthrite rhumatoïde
Transglutaminase	Ubiquitaire	Digestion du gluten	Maladie coeliaque
Acides nucléiques			
ADN	Ubiquitaire	Support génétique	LED
Complexes ribonucléiques (U_1RNP)	Ubiquitaire	Splicéosomes	LED
Lipides			
Phospholipides	Ubiquitaire	Constituant membranaire	Syndrome des anti-phospholipides
Polysaccharides			
Antigène I	Erythrocytes et ubiquitaire	Structure des Ags des groupes sanguins	Anémies hémolytiques

GABA, acide gamma-amino butyrique ; LED, lupus érythémateux disséminé ; RNP, ribonucléoprotéines ; TSH, *Thyroid Stimulating Hormone*.

Les mécanismes effecteurs de l'auto-immunité peuvent faire intervenir l'immunité cellulaire et/ou l'immunité humorale. Les autoAc, les cellules T cytotoxiques et d'autres effecteurs cellulaires ou moléculaires recrutés par les cellules auto-immunes, constituent les mécanismes lésionnels au cours des MAI.

B- Les mécanismes lésionnels des effecteurs auto-immuns

1/ LES AUTOANTICORPS : DES FACTEURS LESIONNELS MAJEURS

La preuve la plus éloquente du caractère pathogène des autoAc est la capacité de transférer la maladie par le sérum des malades atteints d'une MAI. Cette démonstration peut être faîte, soit chez l'animal par le transfert passif du sérum à des animaux normaux, soit chez l'homme, par transfert transplacentaire des autoAc de classe G de la mère atteinte au fœtus. Ainsi, la myasthénie [Gardnerova, 1997], l'hyperthyroïdie [Hollingsworth, 1976], le pemphigus [Anhalt, 1982] peuvent-ils être induits chez la souris par le transfert d'IgG isolées à partir du sérum de malades. Le transfert d'autoAc de la mère à son fœtus est par exemple responsable de myasthénie néonatale [Gardnerova, 1997], d'hyperthyperthyroïdie ou de pemphigus vulgaire [Chowdhury, 1998].

Les mécanismes par lesquels les autoAc induisent des lésions cellulaires ou tissulaires sont divers. Quatre grands mécanismes peuvent être mis en jeu (Tableau 5, figure 3).

Tableau 5. Mécanismes lésionnels des autoanticorps

Mécanismes	**Maladies auto-immunes**
CYTOLYSE DIRECTE	
Complément dépendante	LED
Cellulaire dépendante des Ac (ADCC)	Myocardite
BLOCAGE FONCTIONNEL	
D'une molécule circulante	
D'une molécule membranaire par :	
○ Blocage stérique	Myasthénie, thyroïdite, anémie de Biermer
○ Modulation antigènique	Myasthénie
STIMULATION FONCTIONNELLE	
D'un récepteur	Myasthénie, hyperthyroïdie, encéphalite de Rasmussen
D'une activité enzymatique	Pemphigus, LED
INFLAMMATOIRE	
Complexes immuns	LED, glomérulonéphrites

LED, lupus érythémateux disséminé.

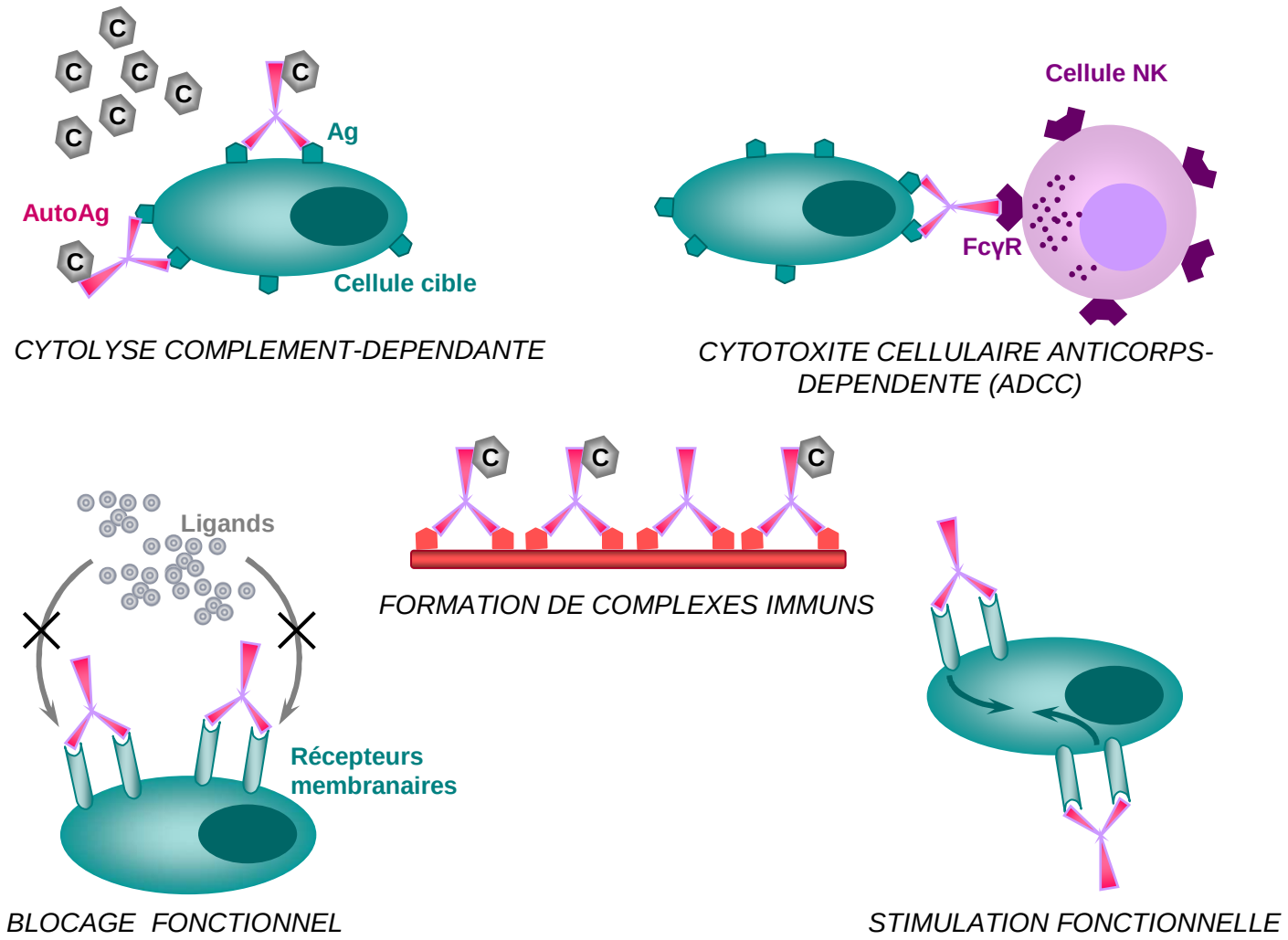


Figure 3. Exemples de mécanismes lésionnels autoanticorps dépendants.

La cytolyse de la cellule cible peut être secondaire à l'activation du complément. Au cours des anémies hémolytiques par exemple, les Ac anti-I fixés à la surface des érythrocytes activent le complément *via* la voie classique. Cette activation aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire C5b9 qui forme des pores dans la membrane du globule rouge et induit la lyse cellulaire. Au cours de la pemphigoïde bulleuse, une maladie bulleuse auto-immune de la jonction dermoépidermique, des dépôts du fragment C3 du complément et d'IgG sont présents au siège du décollement dermoépidermique responsable de la formation de bulles cutanées chez les malades [Mouquet, 2005]. De plus, dans le modèle expérimental murin de la pemphigoïde induite par transfert passif d'Ac dirigés contre l'autoAg cible de la maladie humaine, l'activation du complément est indispensable [Liu, 1995]. La cytolyse médiée par les autoAc peut aussi faire intervenir les cellules monocytaires/macrophagiques. Ces cellules peuvent

fixer par leur récepteur du fragment Fc des IgG (FcγR), les cellules cibles recouvertes des autoAc spécifiques d'un Ag qu'elles expriment, les phagocyter et enfin les détruire. La phagocytose des plaquettes par les macrophages au cours des thrombopénies auto-immunes illustre ce mécanisme. La cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) constitue un troisième mécanisme lésionnel de cytolyse directe. Cette cytotoxicité est exercée par des cellules mononuclées en particulier les cellules NK (*natural killer*). Les lymphocytes NK s'activent *via* l'interaction entre leurs FcγR et les autoAc recouvrant les cellules et libèrent des granules lysosomiaux contenant des enzymes, les granzymes (sérines-estérases) et la perforine, qui vont détruire la cellule cible. Ce mécanisme interviendrait dans la destruction des cardiocytes au cours des myocardites [Anand, 1983].

Certains autoAc ont la capacité de se lier à des récepteurs membranaires et d'en modifier l'expression ou les fonctions biologiques. La myasthénie en fournit l'illustration la plus éloquente. Des expériences de culture de lignées de cellules musculaires exprimant de récepteur à l'acétylcholine (ACh) réalisées en présence de sérum de malades atteints de myasthénie ont montré que le pontage des récepteurs par les autoAc s'accompagne de leur internalisation et d'une augmentation de leur dégradation. Cette modulation de l'expression membranaire du récepteur à l'ACh altère la transmission neuromusculaire qui caractérise la maladie. Un second mode d'action de ces autoAc anti-récepteur à l'Ach pourrait être le blocage par encombrement stérique de la liaison de l'ACh à son récepteur [Eymard, 1997]. La thyroïdite de Hashimoto illustre également le blocage par des autoAc de la liaison d'un ligand à son récepteur. En effet, certains malades atteints de thyroïdite de Hashimoto présentent des autoAc qui bloquent le récepteur de la TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) et cette fixation provoque une inhibition des fonctions thyroïdiennes [Mukhtar, 1975]. A l'instar, dans la maladie de Basedow, les autoAc anti-récepteurs de la TSH sont capables d'activer ce récepteur et ainsi d'induire une hyperthyroïdie avec sécrétion accrue d'hormones thyroïdiennes [Geenen, 2001]. Ce mécanisme d'activation d'un récepteur par des autoAc est aussi invoqué dans l'encéphalite de Rasmussen, qui est caractérisée par une production d'Ac dirigés contre le récepteur d'un neurotransmetteur, le glutamate, à l'origine d'une épilepsie sévère et d'une démence progressive chez l'enfant [Rogers, 1996].

D'autres populations d'autoAc, dont la cible correspond à une protéine de surface cellulaire, semblent capables d'induire après leur fixation, la formation de seconds messagers et la transduction de signaux aboutissant à l'activation cellulaire. Ce mode d'action des autoAc est incriminé dans la physiopathologie des pemphigus et sera développé dans la partie qui lui est consacrée.

Un autre mécanisme lésionnel des autoAc est lié à la formation de complexes immuns. Ces complexes peuvent se former soit dans la circulation puis se déposer au niveau des tissus, soit *in situ*, l'Ag se déposant en premier avant d'être reconnu par les autoAc circulants. Ces mécanismes de formation de dépôt des complexes immuns conduisent à l'activation du complément, à la libération d'anaphylatoxines, au recrutement et à l'activation des polynucléaires neutrophiles qui participent aux lésions inflammatoires. Les glomérulonéphrites observées au cours du LED en constituent sans doute un bon modèle [Clough, 1992]. Les autoAc se fixent à leurs cibles, notamment l'ADN et les constituants du nucléosome, insérés dans la membrane basale des glomérules et/ou les complexes immuns s'y déposent. Ceci entraîne l'activation du complément et la libération d'anaphylatoxines qui accroissent l'accès de la membrane basale par contraction des cellules endothéliales. L'altération de la membrane basale glomérulaire est dûe à trois mécanismes : (i) directement par dépôts des complexes immuns, les Ac et le complément modifiant les propriétés électrostatiques de la membrane basale, ayant pour conséquence la fuite de protéines du sérum dans les urines (protéinurie) ; (ii) indirectement par le recrutement de polynucléaires neutrophiles qui sécrètent des enzymes digérant la membrane basale, et, (iii) par accumulation dans le temps de complexes immuns sur la membrane basale, faisant perdre au glomérule son pouvoir filtrant.

Dans certains cas on invoque la pénétration intracellulaire des autoAc. En effet, des autoAc sont capables de pénétrer à l'intérieur d'une cellule vivante, d'atteindre leur Ag par exemple nucléaire et, ainsi de modifier les fonctions cellulaires [Alarcon-Segovia, 1996a ; Alarcon-Segovia, 1996b]. C'est le cas des Ac anti-ribonucléoprotéines (RNP) et anti-ADN produits au cours du LED ou encore des Ac anti-Hu produits au cours des encéphalites paranéoplasiques observées chez les patients présentant un cancer du poumon à petites cellules. La mise en évidence de la capacité qu'ont certains Ac de pénétrer à l'intérieur des cellules ouvre donc de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes par lesquels certains autoAc dirigés contre des Ag intracellulaires participent au dysfonctionnement de certaines catégories cellulaires et donc de certains organes.

2/ LES EFFECTEURS LYMPHOCYTAIRES T

Le diabète de type 1 et la sclérose en plaques représentent deux prototypes de MAI médiées par les lymphocytes T. La première démonstration du caractère auto-immun du diabète de type 1 a été fournie par la détection d'autoAc dirigés contre les cellules β des îlots de Langerhans dans les sérums d'individus prédiabétiques ou diabétiques. Les modèles de diabète de type 1 spontané chez la souris NOD (*Non Obese Diabetic*) ou chez

les rats BB (*bio-breeding)* ont toutefois démontré que la destruction des cellules β, caractéristique de la maladie humaine, est dépendante et assurée par les lymphocytes T, les cellules T CD4+ et CD8+ étant toutes deux nécessaires [Tisch, 1996]. La spécificité du diabète de type 1 chez l'homme est l'infiltration cellulaire des îlots pancréatiques (ou insulite). Les études immunohistochimiques ont montré que ces cellules sont majoritairement des lymphocytes T et, plus particulièrement, des lymphocytes T CD8+ auxquels s'associent des macrophages et des lymphocytes B. Le rôle prépondérant des effecteurs T dans le développement de la maladie est démontré par le fait que les lymphocytes T purifiés à partir de la rate de souris diabétiques donatrices peuvent transférer le diabète, de manière adoptive, à des souris receveuses syngéniques et non atteintes, les souris NOD-SCID, dépourvues de lymphocytes B et T, par exemple. L'induction du diabète chez l'animal receveur n'est possible que si les deux populations T CD4+ et CD8+ issues des souris diabétiques sont transférées et, ne nécessite ni la présence de lymphocytes B du donneur ni ceux du receveur [Haskins, 1996].

Un mécanisme lésionnel médié par lymphocytes T est également impliqué dans le développement de la sclérose en plaques (SEP), et des modèles animaux d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE). L'EAE peut être induite dans de nombreuses espèces animales par immunisation avec de la myéline du système nerveux central ou certains de ses composants comme la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine protéolipidique (PLP), et la protéine oligodendriale de la myéline (MOG) [Liblau, 1992]. Cette affection peut également être induite passivement par le transfert de lymphocytes T CD4+ autoréactifs à des animaux syngéniques. Il est toutefois essentiel de rappeler que ces maladies s'accompagnent de la production d'autoAc (par exemple d'Ac anti-insuline au cours du diabète ou d'Ac anti-MOG au cours de la SEP) qui constituent de bons marqueurs de la réponse auto-immune spécifique.

C- Les modèles expérimentaux de maladies auto-immunes

Les modèles animaux de MAI, qu'ils soient spontanés ou induits, sont à l'origine de progrès formidables sur la compréhension des mécanismes de rupture de la tolérance, des mécanismes effecteurs de la réponse auto-immune, et des bases génétiques qui concourent à la survenue de la maladie chez l'homme. A ce titre, l'exploitation du modèle NOD ou encore des souris lupiques a fourni une profusion d'aperçus sur la complexité de survenue des manifestations auto-immunes. Ces modèles permettent notamment d'attribuer aux autoAg un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire.

1/ LES MODELES SPONTANES

La souris NOD [Anderson, 2005b]

La souris NOD, obtenue au Japon par Makino *et al* à la fin des années 1960, constitue vraisemblablement le plus informatif et important modèle expérimental de diabète de type 1. L'incidence de la maladie chez la souris NOD est de 60-80% pour les femelles et de 20-30% pour les mâles. Comme certains malades atteints de diabète de type 1, la souris NOD conjugue de manière globale, une propension génétique pour une auto-immunité multi-organe. En effet, la souris NOD peut également développer d'autres manifestations auto-immunes telles qu'une thyroïdite auto-immune, une polyneuropathie périphérique auto-immune, une sialite auto-immune ou une anémie hémolytique. Le diabète survient entre la 12e et 14e semaine chez les femelles et un peu plus tard chez les mâles. Les études histologiques ont montré que des infiltrats de cellules mononuclées sont présents autour des îlots de Langerhans (péri-insulite) des souris mâles et femelles à partir d'environ 3-4 semaines d'âge et, qu'ils envahissent progressivement les îlots (insulite) préalablement à la survenue du diabète. La majorité des cellules qui composent ces infiltrats sont des lymphocytes T CD4+ bien que des lymphocytes T CD8+, des cellules NK, des lymphocytes B, des cellules dendritiques et macrophages peuvent aussi être identifiés dans les lésions. Plusieurs arguments prouvent que la maladie chez la souris NOD est essentiellement médiée par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ : la capacité de transférer passivement le diabète à des souris receveuses saines par des cellules T CD4+ et CD8+ purifiés à partir de souris NOD ou de clones T (restreints par les molécules du CMH de classe I et de classe II) dérivés des îlots des souris NOD ou encore le fait que les thérapies modulant les cellules T inhibent l'incidence de la maladie. La souris NOD développe également des autoAc contre des Ag des cellules β des îlots pancréatiques de Langerhans. Tandis que le diabète est transférable par transfert passif de splénocytes issus d'animaux malades, il ne peut cependant pas être transféré par les autoAc de souris diabétiques, bien que les cellules B soient clairement impliquées dans le développement de la maladie. L'inflammation suivie de la destruction des cellules β productrices d'insuline par les cellules T autoréactives est la conséquence du diabète d'origine auto-immune. L'administration d'alloxane qui détruit sélectivement les cellules β des îlots de Langerhans préalablement à la survenue de la maladie, prévient l'apparition des autoAc et des effecteurs cytotoxiques dirigés contre les Ag pancréatiques et souligne que la présence de l'autoAg est indispensable pour induire la réponse auto-immune [Larger, 1995].

Les souris lupiques

Plusieurs modèles murins développent un lupus spontané caractérisé par des manifestations voisines de la maladie humaine. Quatre lignées de souris lupiques sont particulièrement étudiées : les souris NZB (*New Zealand Black*), les hybrides (NZB x NZW)F1 ou BW, les souris MRL-*lpr/lpr* et les souris BXSB. Chaque modèle a ses propres caractéristiques génotypiques, phénotypiques et pathologiques soulignant ainsi la diversité et la nature polygénique de la maladie lupique. Il n'en demeure pas moins qu'il existe des caractéristiques communes à ces quatre lignées : l'hypergammaglobulinémie, l'activation polyclonale des lymphocytes B liée à une hyperactivité intrinsèque et/ou une réponse accrue de ces cellules à des facteurs de stimulation, la production d'Ac dirigés contre des constituants nucléaires (par exemple l'ADN, les histones), la commutation de classe précoce d'IgM en IgG, la formation de complexes immuns, les glomérulonéphrites, l'implication des lymphocytes T CD4+. L'étude des croisements entre souches auto-immunes et souches normales a montré que chaque anomalie immunologique était sous contrôle génétique (polygénique) *via* des gènes de fonction et/ou des gènes de régulation [Kotzin,1997 ; Morel, 2000 ; Morel, 2001]. Des gènes accélérateurs ou inhibiteurs de la maladie lupique ont aussi été identifiés. Par exemple, l'introduction du gène *lpr* (codant pour une forme anormale de la molécule Fas) dans une lignée lupique induit une accélération de la maladie. Par ailleurs, le gène lié au chromosome Y des souris BXSB, soit le gène *Yaa* est à l'origine de la gravité de la maladie chez les mâles de cette lignée. Cette mutation n'a été identifiée que très récemment et consiste en la duplication du gène codant pour le récepteur TLR7 [Pisitkun, 2006]. Ainsi, l'expression plus élevée de TLR7 sur les cellules B conduirait-elle à une augmentation de leur sensibilité vis à vis des Ag nucléaires contenant de l'ARN. L'analyse des nombreux modèles murins de LED cités ci-dessus a largement contribué à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques qui concourent au développement de la maladie notamment, à l'identification d'anomalies lymphocytaires T et B.

Ces modèles spontanés de LED ont par ailleurs apporté d'autres arguments sur l'intervention de l'autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune grâce à l'analyse du compartiment lymphocytaire B et de l'analyse structurale des autoAc dirigés contre l'ADN dont la production constitue une anomalie majeure du LED. Ces modèles ont notamment permis l'obtention d'Ac monoclonaux (Acm) anti-ADN dont la caractérisation a montré que l'expansion des cellules B autoréactives spécifiques de cet autoAg est clonale et sélectionnée par l'Ag [Radic, 1994]. En effet, l'analyse des caractéristiques structurales des chaînes lourdes (H) et légères (L) des Acm anti-ADN dérivés de souris MRL-*lpr/lpr* et BW a montré que leur spécificité est la conséquence de mécanismes de diversification identiques à ceux observés au cours de la réponse dirigée par un Ag exogène. Certains

gènes V_H non polymorphes sont utilisés préférentiellement pour élaborer une réponse anti-ADN et de façon récurrente par des hybridomes sécrétant des Acm anti-ADN. En outre, ces clones portent également des mutations somatiques qui génèrent des aminoacides créant ou amplifiant la spécificité pour l'ADN. De la sorte, l'accumulation de résidus chargés positivement, arginine ou lysine, dans les domaines variables des chaînes H et L confèrent aux Ac anti-ADN des propriétés de protéines de liaison à l'ADN. La troisième région déterminant la complémentarité (CDR3) des chaînes H des Acm anti-ADN comporte fréquemment des résidus arginine et lysine, capables de se lier aux structures anioniques de l'ADN [Shlomchik, 1987 ; Shlomchik, 1990]. En définitive, même si le rôle d'une activation polyclonale lymphocytaire semble intervenir au cours du LED, tous les arguments expérimentaux convergent pour considérer que l'activation des clones B autoréactifs est la conséquence d'un processus dirigé par l'autoAg.

La thyroïdite du poulet obèse

La thyroïdite du poulet obèse développée par une souche de poulet issue de celle de *White Leghorn*, constitue un modèle de thyroïdite auto-immune. Cette pathologie est caractérisée par une hyperthyroïdie qui est liée à la destruction de la glande thyroïdienne secondaire à une réponse auto-immune dirigée contre des Ag thyroïdiens comme la thyroglobuline et/ou la thyropéroxydase, molécules impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Les signes cliniques sont des dépôts de graisse sous-cutanés principalement abdominaux, des anomalies des os et des phanères ainsi qu'une hypersensibilité au froid. Les poulets obèses dont la pathologie ressemble à la thyroïdite de Hashimoto présentent de nombreuses anomalies immunitaires. Les Ac dirigés contre des Ag thyroïdiens, notamment la thyroglobuline, détectés dans le sérum de ces poulets ont un titre qui culmine au cours de la 7e semaine de vie. Les contributions des cellules T et B aux anomalies lymphocytaires observées ont été respectivement étudiées par des expériences de thymectomie et de bursectomie [Vasicek, 2001]. Elles révèlent que la thyroïdite peut être prévenue par la bursectomie *in ovo* et que celle-ci peut être aggravée par la thymectomie néonatale. L'injection de cellules isolées des bourses de Fabricius de poulets sains à des poulets de la souche obèse bursectomisés ne prévient pas la survenue de la thyroïdite. De même, l'injection de cellules bursiques de poulets obèses à des poulets normaux bursectomisés n'induit pas la maladie. En revanche, le transfert de cellules T de poulets obèses à des poulets normaux irradiés provoque la thyroïdite tandis que le transfert de cellules T normales à des poulets obèses irradiés la prévient. L'ensemble de ces données suggère une défaillance des cellules T suppressives avec des effets prédominants portant notamment sur la production des autoAc anti-Ag thyroïdiens [Wick, 1989].

1/ LES MODELES INDUITS

Plusieurs modèles de MAI induites ont été développés chez l'animal, dans différentes espèces, en leur injectant des extraits d'organe ou des autoAg purifiés en présence d'adjuvant. A titre d'exemple, nous décrirons deux modèles de MAI expérimentales induites : la thyroïdite allergique expérimentale et l'EAE, qui miment les MAI développées spontanément et qui permettent l'étude de leurs mécanismes physiopathologiques.

La thyroïdite allergique expérimentale [Stafford, 2000]

L'injection d'extraits thyroïdiens homologues émulsifiés dans de l'adjuvant complet de Freund à des cobayes, des souris ou des rats provoque l'apparition d'une thyroïdite chez ces animaux. La maladie ressemble en de nombreux points à la thyroïdite de Hashimoto et à la thyroïdite du poulet obèse décrite précédemment. Les lésions thyroïdiennes s'accompagnent de la perte de l'architecture folliculaire normale et d'une infiltration de cellules mononuclées. Les manifestations auto-immunes induites sont proches de celles observées au cours de la maladie humaine avec notamment, une production d'autoAc dirigés contre la thyroglobuline et une hypersensibilité retardée vis à vis de cette protéine [Stafford, 2000]. La maladie est contrôlée génétiquement, à la fois au niveau de la réponse immunitaire T anti-thyroglobuline (par un *locus* situé dans la région I-A du CMH de classe II de la souris) et de façon intéressante au niveau de l'autoAg lui-même ; la thyroglobuline de certaines souches entraînant plus facilement l'apparition de la maladie. Cinq peptides pathogéniques de la thyroglobuline ont été identifiés. Le peptide le plus court, le peptide 2496-2504 de la thyroglobuline de rat, est capable d'induire directement une thyroïdite chez les souris d'haplotype H-2^K et H-2^S. En outre, les seuls peptides connus pour provoquer une réponse B associée au développement de la maladie expérimentale sont les peptides 2549-2560 de la thyroglobuline humaine et 2495-2511 de la thyroglobuline de rat. Le pouvoir pathogène des autoAc a été démontré par : la prévention du transfert de la maladie d'un animal malade à un animal normal par incubation des lymphocytes B avec de la thyroglobuline fortement radiomarquée ; la possibilité de transférer la maladie par le sérum administré toutefois en quantité suffisante. A la différence de la thyroïdite du poulet obèse, la thyroïdite provoquée est prévenue par la thymectomie néonatale. Les cellules T interviennent donc aussi, sans doute, essentiellement en tant que cellules T auxiliaires dans la production des autoAc.

L'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE)

L'EAE est une MAI démyélinisante du système nerveux central qui peut être induite dans de nombreuses espèces animales (rongeurs, lagomorphes, primates, poulets…) en particulier chez la souris, par immunisation avec de la myéline du système nerveux central ou certains de ses composants comme la MBP, la PLP et la MOG. Ses manifestations cliniques et pathologiques ressemblent en de nombreux points à celles de la SEP. Histologiquement, les lésions sont caractérisées par une infiltration périvasculaire de cellules mononuclées, prédominant au niveau de la moelle épinière, constituée de nombreux lymphocytes T et de macrophages, et par une démyélinisation d'intensité variable. Il est actuellement clairement établi que les lymphocytes T CD4+, spécifiques de composants de la myéline, sont à la base du processus pathogène. En effet, les lésions histologiques de l'EAE ressemblent à une réaction d'hypersensibilité retardée et, dans la plupart des études, il existe une bonne corrélation entre la survenue de l'EAE et l'existence d'une réaction d'hypersensibilité retardée vis à vis des Ag de la myéline. De plus, l'EAE peut être induite par transfert adoptif de lymphocytes T CD4+ autoréactifs à des animaux syngéniques. Bien qu'une grande variété d'Ac spécifiques de plusieurs Ag de la myéline en particulier, la MOG et la MBP, soit détectée dans le sérum d'animaux atteints, l'implication des cellules B et des autoAc dans la physiopathologie de l'EAE reste très controversée. Signalons par ailleurs, que le développement de l'EAE est génétiquement contrôlé, lié au moins partiellement et de façon polygénique au CMH.

Dans d'autres modèles expérimentaux, les manifestations auto-immunes chez l'animal peuvent être induites par l'injection de l'autoAg sous forme recombinante ou purifié à partir du tissu qui l'exprime. Par exemple, l'injection intradermique de collagène de type II extrait de cartilage humain en présence d'adjuvant complet de Freund à différentes lignées de rat induit une arthrite inflammatoire dans 40% des cas. La maladie se caractérise par une synovite proliférative ressemblant à la polyarthrite rhumatoïde chez l'homme. Les réponses lymphocytaires T et B sont dirigées contre des déterminants antigèniques localisés principalement sur le fragment CB11 issu de la digestion du collagène II par le bromure de cyanogène. En effet, l'épitope 58-73 du fragment CB11 stimule aussi efficacement que la molécule complète la prolifération *in vitro* de lymphocytes T issus de souris dont l'arthrite a été induite par le collagène II. De plus, l'administration du peptide 58-73 à des rats prévient l'induction de la maladie par le collagène, démontrant ainsi *in vivo* que la réponse immunitaire dirigée contre ce peptide intervient dans la pathogénèse de l'arthrite [Ku, 1993]. En outre, le rôle pathogène des autoAc anti-collagène II a été démontré par des expériences de transfert passif. En effet, le

transfert de la maladie a été observé après (i) injection à des rats (ou à des souris) sain(e)s d'IgG provenant de rats (ou de souris) immunisé(e)s avec du collagène de type II.

Certaines données expérimentales, notamment issues de l'étude de l'évolution de la réponse auto-immune chez ces modèles animaux, permettent de penser que les MAI sont initiées par une réponse dirigée contre un Ag unique, qu'il soit spécifique ou non d'un tissu. Secondairement, la réponse auto-immune s'étend vers d'autres déterminants du même Ag ou d'autres Ag du même tissu, selon le phénomène d'extension épitopique intramoléculaire et intermoléculaire qui rend compte de la diversité des spécificités Ac observée au cours d'une même MAI [Lehmann, 1993 ; Mamula, 1998].

Ce premier chapitre doit être particulièrement considéré du point de vue de l'intervention de l'autoAg dans le développement des MAI. En effet, au niveau des phénomènes de tolérance immunitaire, l'autoAg joue un rôle essentiel notamment, par son expression thymique qui intervient dans les phénomènes de sélection négative des cellules T autoréactives et de sélection positive des lymphocytes T régulateurs. Une anomalie de cette expression ectopique des autoAg au niveau du thymus participe très certainement à l'induction de MAI systémiques et spécifiques d'organe comme l'illustre l'APECED. Par ailleurs, il est fondamental d'insister sur le fait que l'étude des modèles expérimentaux de MAI, qu'ils soient spontanés ou induits, a entre autres permis d'attribuer aux autoAg un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire. Dans ce second chapitre consacré au rôle de l'autoAg dans les MAI, nous allons exposer de manière plus précise par quels mécanismes l'autoAg prend part à l'initiation, la propagation et la pérennisation de la réponse auto-immune.

Chapitre 2 : Le Rôle des Autoantigènes au cours des Maladies Auto-immunes

Les MAI sont caractérisées par des manifestations pathologiques qui sont la conséquence directe de l'interaction des autoAg cibles avec les mécanismes effecteurs du système immunitaire (autoAc et/ou lymphocytes T CD8 cytotoxiques). Le rôle clef de l'autoAg lui même dans l'initiation, la propagation et la pérennisation de la réponse auto-immune a été mis en exergue et cela, en raison de ses caractéristiques structurales, de sa localisation, de ses modifications, de son apprêtement ou de sa modalité de présentation aux cellules du système immunitaire. [Zinkernagel, 1997 ; Zingernagel, 2001 ; Mocci, 2000].

I. L'AUTOANTIGENE INITIE ET CONDUIT LA REPONSE AUTO-IMMUNE

Les arguments les plus directs du rôle de l'autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune sont issus de modèles animaux au cours desquels l'ablation ou l'élimination de l'organe cible prévient la mise en jeu de la réponse auto-immune. Ainsi, dans le modèle de la thyroïdite du poulet obèse, la thyroïdectomie du poulet à la naissance prévient-elle l'apparition des autoAc et des lymphocytes T autoréactifs dirigés contre les Ag thyroïdiens tels que la thyroglobuline et la thyropéroxydase. De même chez la souris NOD, la destruction sélective les cellules β de Langerhans par l'administration d'alloxane prévient l'apparition des autoAc et des lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les Ag pancréatiques. Chez l'homme, certaines observations suggèrent également que la suppression de l'autoAg s'accompagne de la diminution d'une réponse auto-immune établie. C'est ainsi qu'au cours du diabète de type 1, la destruction complète des cellules β des îlots de Langerhans par le processus lésionnel, peut s'accompagner d'une diminution, voire d'une disparition des autoAc dirigés les Ag pancréatiques cibles. On a également rapporté la diminution des taux d'Ac anti-thyroglobuline et anti-thyropéroxydase chez les malades souffrant d'une maladie de Basedow et subissant une thyroïdectomie. A ces arguments directs s'associent des arguments indirects fondés sur l'analyse des caractéristiques structurales des autoAc et des TCR exprimés par les lymphocytes autoréactifs au cours des MAI spécifiques d'organe et non spécifiques d'organe. Au cours des MAI spécifiques d'organe, ces arguments sont issus de l'analyse des chaînes β du TCR exprimées par les clones T sélectionnés sur leur capacité à reconnaître des autoAg de l'organe cible. C'est ainsi que des clones T Vβ13.1 dirigés contre un peptide immunodominant de la MBP et partageant une CDR3 ont été observés chez plusieurs malades atteints de SEP [Oksenberg, 1993]. Des CDR3 de séquences

identiques ont été également identifiés dans les chaînes β du TCR des cellules T CD4+ isolées de malades atteints de maladie coeliaque [Prisco, 1997]. Cette démonstration d'une identité structurale entre clones lymphocytaires T spécifiques d'un même autoAg et isolés de différents patients atteints d'une même MAI est un argument majeur en faveur de l'intervention d'un autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune.

Etant donné le rôle de l'autoAg dans la survenue du processus auto-immun, il est logique de penser que des variations dans sa localisation, ses caractéristiques structurales, son niveau et ses modalités d'expression jouent un rôle essentiel dans sa capacité à activer les lymphocytes T et B autoréactifs.

II. LA SEQUESTRATION DES AUTOANTIGENES

A- La séquestration anatomique

Malgré la démonstration de la présence d'une multiplicité d'Ag tissu-spécifiques dans le thymus humain, certains Ag sont exclusivement exprimés au niveau d'un tissu et ne permettent donc pas la sélection négative des clones T autoréactifs qui *in fine*, vont circuler en périphérie [Sebzda, 1999]. Cette séquestration anatomique d'Ag du soi peut rendre compte de la rupture de la tolérance lorsque ces molécules sont anormalement libérées, apprêtées par les molécules du CMH et présentées aux cellules T autoréactives passées à la périphérie [Sebzda, 1999]. C'est le cas des Ag séquestrés (Ag portés par les spermatozoïdes ou le cristallin) dont la libération anormale à l'occasion d'un traumatisme ou d'une infection, peut induire la survenue d'une MAI spécifique d'organe (orchite auto-immune secondaire à une vasectomie, ophtalmie sympathique consécutive à une intervention sur l'œil). Par ailleurs, certains syndromes paranéoplasiques neurologiques pourraient relever d'un tel mécanisme en raison de l'expression anormale par les cellules tumorales de l'Ag qui était jusqu'ici ignoré par le système immunitaire avant son expression ectopique [Darnell, 1996].

B- La séquestration moléculaire [Moudgil, 2005]

Il existe un autre type de séquestration présentée par certains autoAg, dite séquestration moléculaire. En effet, au sein d'une protéine, certains peptides ont une forte affinité pour les molécules du CMH et sont présentés de façon privilégiée aux TCR par rapport à d'autres peptides de cette protéine. Il existe donc une hiérarchie peptidique des Ag du soi qui sont dits dominants, sous-dominants ou cryptiques selon leur capacité à s'associer aux molécules du CMH. Les principes de cette théorie sont que : (i) tout Ag protéique et notamment les Ag du soi, présente une minorité d'épitopes immunodominants impliqués dans la sélection négative et responsables de la tolérance T efficace ; (ii) à l'inverse, la majorité des déterminants d'une protéine sont cryptiques, c'est

à dire qu'ils ne sont pas efficacement apprêtés et présentés aux clones T potentiellement autoréactifs vis à vis de ces déterminants. Ce mécanisme aboutit donc à un défaut de tolérisation des lymphocytes T spécifiques d'épitopes sous-dominants ou cryptiques qui gagnent alors la périphérie. Certaines circonstances contribuent à la présentation de déterminants antigéniques cryptiques aux cellules T et par conséquent, à l'induction d'une réponse auto-immune. Par exemple, lors d'infection virale ou bactérienne, un peptide porté par l'agent pathogène peut être identique structuralement à un épitope cryptique d'un Ag du soi (phénomène de mimétisme moléculaire) qui dans ce contexte, peut devenir immunodominant. Une réaction inflammatoire peut aussi constituer une situation propice à l'apprêtement et la présentation d'épitopes cryptiques par les CPA. Au cours de l'inflammation, la formation de complexes immuns peut faciliter l'immunogénicité de peptides cryptiques étant donné que l'Ag complexé comme substrat de la machinerie cellulaire peut moduler l'apprêtement de l'Ag par rapport à sa forme libre et notamment, augmenter de 10 à 100 fois sa présentation par les molécules du CMH de classe II.

Cette « désequestration » de l'autoAg au niveau moléculaire, illustrée par ces différents mécanismes, ne concerne pas seulement l'initiation de la réponse immunitaire mais également sa pérennisation et son extension *via* le phénomène d'extension épitopique [Vanderlugt, 2002]. En effet, on considère que la première vague de la réponse immune dirigée contre des épitopes cryptiques est suivie par des vagues successives de réponses contre des déterminants antigéniques de la même molécule (extension épitopique intramoléculaire) ou de molécules physiquement liées (extension épitopique intermoléculaire). Ce phénomène pourrait rendre compte de la diversification de la réponse auto-immune contre différents Ag de l'organe cible que l'on observe fréquemment au cours de MAI spécifiques et non spécifiques d'organe.

III. LES MODIFICATIONS DES ANTIGENES DU SOI

Une importante interrogation concernant la rupture de tolérance est de déterminer si les autoAg sont normaux ou modifiés, les deux situations étant apparemment possibles [Doyle, 2002]. La théorie du soi modifié constitue néanmoins, une hypothèse plus séduisante pour rendre compte du déclenchement d'un processus d'auto-immunité chez l'homme. Les modifications des Ag du soi par les métaux lourds, au cours des processus d'apoptose, de cancer, de réparation tissulaire ainsi que celles générées par des modifications co- et post-traductionnelles seront traitées dans cette partie.

A- Modifications de l'autoantigène par les métaux lourds

La création de néo-autoAg peut être la conséquence de l'interaction entre les Ag du soi et les métaux lourds. Les métaux tel que l'or, possède une forte capacité oxydative qui peut être responsable de l'oxydation des chaînes latérales des aminoacides constituant les Ag protéiques et, ainsi, conduire à leur dénaturation. Par ailleurs, des complexes protéine-métal peuvent se former *via* la fixation des métaux aux chaînes latérales des protéines. Ces deux mécanismes pourraient être à l'origine d'une activation de cellules T n'ayant pas été tolérisés vis à vis de ces peptides du soi altérés [Griem, 1995].

B- Modifications de l'autoantigène et processus apoptotique

Un autre exemple du rôle des déterminants néo-antigéniques dans l'induction d'une réponse effectrice est fourni par les modifications des autoAg reconnus par les autoAc à l'occasion du phénomène d'apoptose rencontré au cours du LED. Certains Ag reconnus au cours du LED subissent des modifications de concentration, de distribution cellulaire et de structure au cours de l'apoptose et ce sont ces modifications qui interviendraient dans l'initiation et la propagation de la réponse auto-immune au cours de la maladie [Casciola-Rosen, 1994]. Le premier constat est que les autoAg cibles au cours du LED subissent une redistribution géographique dans la cellule en apoptose, plus spécifiquement une concentration et un regroupement dans les vésicules de surface des cellules apoptotiques. En effet, les vésicules apoptotiques sont considérablement enrichies en Ag ribosomaux, protéines Ro et La, snRNP, poly(ADP-ribose) polymérase qui ont normalement une distribution nucléaire diffuse [Casciola-Rosen, 1994]. En outre, la surface des vésicules apoptotiques exprime la phosphatidylsérine qui à la capacité de se lier à des protéines qui sont la cible de la réponse au cours de MAI non spécifiques d'organe, comme la β2-glycoprotéine et l'annexine V. Ces observations suggèrent que la vésicule apoptotique et son contenu antigénique constituent la source des immunogènes majeurs au cours du LED à l'origine de la réponse autoAc si particulière de la maladie. La deuxième observation majeure est que certains des autoAg mentionnés précédemment sont des substrats d'enzymes protéolytiques mises en jeu au cours du processus apoptotique. Par exemple, la poly(ADP-ribose) polymérase subit un clivage protéolytique par une famille de protéases à cystéine appelées caspases [Yamanaka, 1987]. Des travaux ultérieurs ont montré le clivage par les caspases, d'autres Ag impliqués au cours du LED [Yamanaka, 1987 ; Waterhouse, 1996 ; Martin, 1995 ; Casiano, 1996 ; Takeda, 1999]. D'autres modifications structurales pourraient affecter les autoAg au cours du processus apoptotique. A cet égard, il a été montré qu'au cours du LED, les autoAc ciblent fréquemment des protéines sélectivement phosposphorylées durant l'apoptose par des sérine/thréonine-kinases et qui correspondent soit à des Ag déjà identifiés soit à de

nouvelles protéines spécifiques de l'apoptose [Utz, 1997 ; Utz, 1998]. Ces protéines modifiées, c'est-à-dire clivées par une caspase ou modifiées par une kinase pourraient constituer des néo-épitopes vis à vis desquels les cellules T ne sont pas tolérisées qui *in fine* contribueraient à l'activation des lymphocytes B spécifiques de ces Ag. Par ailleurs, il est essentiel de rappeler que des cellules apoptotiques ne sont pas immunologiquement passives, mais peuvent exercer, selon la CPA avec laquelle elles interagissent, un effet positif ou négatif sur le système immunitaire. Par exemple, les cellules dendritiques, à l'inverse des macrophages, présentent de façon efficace les Ag dérivés des cellules apoptotiques et sont capables de stimuler des lymphocytes T [Bellone, 1997]. L'immunisation intraveineuse de souris non auto-immunes avec des thymocytes apoptotiques syngéniques induit la production transitoire d'autoAc, notamment d'Ac anti-cardiolipine et ADN simple brin ainsi que des dépôts glomérulaires d'immunoglobulines rappelant les anomalies biologiques et histologiques du LED [Mevorach, 1998]. Il convient aussi de noter que les vésicules de surfaces des kératinocytes en apoptose se lient au C1q, le premier composant de la voie d'activation classique du complément et qui peut lui conférer un rôle essentiel dans la clairance des cellules apoptotiques. Or, le déficit en C1q est quasiment constamment associé à un LED chez l'homme comme chez les souris invalidées pour le gène du C1q [Korb, 1997]. Tout se passe donc comme si la génération et l'accumulation de vésicules apoptotiques et des Ag modifiés qu'elles contiennent constituent un des mécanismes immunogènes principaux des cellules T et B au cours du LED.

C- Modifications de l'autoantigène et cancer

D'autres modèles défendent le concept du soi modifié dans le déclenchement d'une réponse auto-immune. Des anomalies des gènes codant pour la protéine p53 sont observées chez environ 50% des malades ayant un cancer du poumon ou un cancer du sein parmi lesquels 20 à 30% développent des Ac dirigés contre la protéine p53. L'étude des lignées cellulaires de malades atteints de cancer du poumon a révélé la présence de mutations du gène p53 qu'il s'agisse de mutations ponctuelles, de mutations générant un codon stop ou de mutations décalant le cadre de lecture. Ces mutations ponctuelles peuvent être à l'origine de la production de protéines p53 dont les fonctions sont altérées et surtout, dont la stabilité intracellulaire est considérablement augmentée en regard de la protéine p53 sauvage qui est rapidement dégradée [Tilkin, 1995]. La première hypothèse est que les autoAc anti-p53 sont dirigés contre la protéine altérée. Cependant, il a été démontré que ces autoAc reconnaissent à la fois la forme mutante et la forme sauvage et notamment des épitopes situés en dehors des points chauds de mutation. Ceci suggère que c'est plus la persistance de la protéine p53 ou la formation de complexes

entre la protéine mutante et d'autres protéines qui est à l'origine de la réponse auto-immune, que la formation de néo-épitopes. Il n'en demeure pas moins que l'hypothèse de la formation de néo-épitopes liée à la mutation de certaines protéines qui sont la cible de la réponse auto-immune au cours du cancer reste une hypothèse attractive dans les phénomènes d'immunisation anti-tumorale [Winter, 1992 ; Davidoff, 1992].

D- Modifications de l'autoantigène au cours des processus de réparation tissulaire

Les modifications de l'autoAg au cours des mécanismes de réparation peuvent également intervenir au cours des MAI. Cet autre aspect de la contribution de l'expression de l'autoAg dans l'autoréactivité est illustré par la démonstration de l'expression d'isoformes embryonnaires de la MBP au cours des processus de remyélinisation observés dans la SEP et dans son modèle expérimental murin, l'EAE. Cette génération d'isoformes de la MBP par des mécanismes d'épissage alternatif et leurs implications dans le processus auto-immun sera détaillée ultérieurement.

E- Modifications co- et post-traductionnelles des autoantigènes

Un autre exemple de formation de néo-Ag susceptible d'induire une rupture de la tolérance est apporté par les modifications co- et post-traductionnelles d'autoAg [Doyle, 2002], comme par exemple, la citrullination des protéines au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR) [Schellekens, 1998]. La citrulline est un constituant majeur des déterminants antigéniques reconnus par les autoAc présents dans le sérum de malades atteints de PR. C'est la déimination des résidus arginine par l'enzyme peptidyl-arginine déiminase qui transforme les résidus arginine en citrulline. L'observation qu'une modification post-traductionnelle des résidus arginine génère des déterminants antigéniques B suggère un nouveau mécanisme de production des autoAc. Une hypothèse est que la tolérance est établie vis à vis de la protéine non modifiée. Ainsi, quand la protéine modifiée et maturée est présentée au système immunitaire, comme par exemple après une lyse cellulaire massive, l'Ag modifié pourrait induire une réponse immunitaire et, par extension épitopique, conduire à une réponse auto-immune polyclonale contre la protéine entière. De nombreux exemples avérés de réponse auto-immune T et B contre des Ag modifiés co- et post-traductionnellement illustrent ce concept (Tableau 6). A l'inverse, il a clairement été démontré qu'au cours du LED et de l'EAE, l'absence d'une de ces modifications pré-existante au niveau physiologique sur un Ag du soi peut également induire une réponse auto-immune.

Tableau 6. Modifications post-traductionnelles associées aux maladies auto-immunes

Modifications	Autoantigènes	Maladies auto-immunes
Glycosylation	Collagène de type II	PR
Phosphorylation	Multiples	LED
Oxydation	LDL	Athérosclérose
Déamidation	Gliadine	Maladie cœliaque
Isoaspartylation	snRNP	LED
Transglutamination	Histone H2B, actine, myosine	LED
Déimination (citrullination)	Fibrine	PR
Nitration des tyrosines	MBP	EAE/SEP
	Multiples (tissu inflammatoire)	LED

EAE, encéphalomyélite allergique expérimentale ; LED, lupus érythémateux disséminé ; LDL, *Light-Density Lipoprotein* ; MBP, protéine basique de la myéline ; PR, polyarthrite rhumatoïde ; SEP, sclérose en plaque ; snRNP, *small nuclear ribonucleoproteins*.

IV. LE POLYMORPHISME GENIQUE DES AUTOANTIGENES

Les MAI sont des maladies complexes dites multifactorielles qui résultent de l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux. Ces maladies polygéniques font intervenir de nombreux *locus* de susceptibilité qui pris isolément, sont le plus souvent ni nécessaires ni suffisants à leur développement. Le déterminisme génétique aux MAI peut schématiquement se placer à 3 niveaux : la réactivité globale du système immunitaire, l'autoAg et sa présentation, la réponse et la sensibilité de l'organe cible. Il est désormais bien établit que la plupart des MAI est associée au *locus* HLA. Cette partie ne traitera que du polymorphisme de l'Ag et de sa contribution, par le biais de différents mécanismes d'action, à la survenue des MAI spécifiques et non spécifiques d'organe (Tableau 7).

Tableau 7. Polymorphismes géniques d'autoantigènes et mécanismes associés

Mécanismes	Autoantigènes	Maladies auto-immunes
TOLERANCE INTRATHYMIQUE	Insuline	Diabète de type 1
PRESENTATION DE L'ANTIGENE	CHRNA	Myasthénie
PRODUCTION D'AUTOANTICORPS	Dsg1	Pemphigus
	β2-GPI	SAPL
	Ro52 kD	Syndrome de Sjögren

CHRNA, sous-unité α du récepteur musculaire à l'ACh ; Dsg1, Desmogléine 1 ; β2-GPI, β2 glycoprotéine I ; SAPL, syndrome des anti-phospholipides.

A- Modèle de la myasthénie

La myasthénie est une MAI caractérisée par la production d'autoAc dirigés contre la sous-unité α du récepteur musculaire à l'acétylcholine (CHRNA). Grâce à l'étude de marqueurs microsatellites situés dans le premier intron du gène *CHRNA*, Garchon *et al* ont démontré l'association entre l'allèle HB*14 d'un des microsatellites et la maladie [Garchon, 1994]. Le mécanisme d'action de ce polymorphisme n'est cependant pas connu et n'est probablement pas direct, ce dernier siégeant sur une séquence intronique et aucune fonction n'étant attribuée aux microsatellites chez les eucaryotes supérieurs. Il s'agit donc probablement de marqueurs génétiques en déséquilibre de liaison avec d'autres polymorphismes fonctionnels. Deux hypothèses ont été émises, l'une impliquant un polymorphisme de régions régulatrices de l'expression du gène, l'autre impliquant un polymorphisme des séquences codantes capables de moduler l'immunogénicité de la protéine. Pour étayer cette hypothèse, et plus précisément la capacité de ce variant à générer des peptides capables de s'associer avec les molécules HLA de susceptibilité, l'effet du marqueur HB*14 sur la distribution des génotypes HLA a été étudié. Cette étude a permis de montrer une augmentation significative du génotype DQA1*0101/0501 chez les patients HB*14 [Djabiri, 1997]. Le rôle propre de l'allèle DQA1*0101 a de plus pu être démontré dans la mesure où les allèles des gènes *DRB1* et *DQB1* en déséquilibre de liaison avec DQA1*0101 ne sont pas associés à la maladie. En revanche, le rôle propre de DQB1*0501 n'a pu être individualisé au sein de l'haplotype étendu DR3. Ces résultats ont conduit à proposer un modèle polygénique de susceptibilité à la myasthénie auto-immune faisant intervenir 3 gènes : le gène de l'autoAg *via* l'existence d'un variant qui serait présenté par le produit du gène DQA1*0101 associé à une chaîne β, la réaction auto-immune étant favorisée par un troisième gène de régulation immune situé sur l'haplotype DR3.

B- Modèle du diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une MAI spécifique d'organe qui est déclenchée par la destruction des cellules β des îlots de Langerhans responsables de la sécrétion d'insuline. C'est la MAI la plus étudiée et la mieux caractérisée sur le plan génétique. L'implication du complexe HLA est connue de longue date (1973) [Singal, 1973 ; Cudworth, 1974] et a été confirmée depuis et évaluée à 40-50% de la composante génétique de la maladie [Thomson, 1988]. L'association la plus forte est retrouvée avec les gènes de classe II (*DRB1*, *DQA1* et *DQB1*) et plus particulièrement avec les allèles DR4 et DR3 dont l'un au moins est retrouvé chez 90% des patients atteints de diabète de type 1 contre seulement 45% de la population générale. D'autres facteurs génétiques non HLA sont également en cause [Risch, 1987]. Parmi les régions

identifiées, *IDDM2* (située sur le bras court du chromosome 11) contient le gène de l'insuline (*INS*) [Bell, 1984 ; Bain, 1992]. Dix variants fortement associés à la maladie ont été identifiés dans un segment génétique de 4,1 kb incluant le gène *INS*. De vastes études d'association analysant la fréquence des différentes combinaisons génotypiques de ces 10 variants, ont permis d'identifier 4 polymorphismes comme étant significativement plus associés à la maladie que les autres [Julier, 1994]. L'un de ces variants correspond à un VNTR (*variable number of tandem repeats*), de la région située en 5' du gène *INS* et contenant un polymorphisme résultant d'un nombre variable de répétition en tandem d'éléments de 14 pb. La taille des différents allèles se répartit selon une distribution trimodale permettant de distinguer 3 classes (classe I: 20 à 63 répétitions, classe II: 64 à 139 répétitions et classe III: 140 à 210 répétitions). Les allèles associés au diabète de type 1 sont les allèles de classe I à l'état homozygote qui sont retrouvés chez 78% des patients contre 45% des témoins. Les allèles de classe I apparaissent donc comme des traits récessifs. Leur rôle peut être envisagé autrement, puisque la présence d'au moins une copie des allèles de classe III (les allèles de classe II étant très rares en Europe) est associée à une diminution du risque de développer la maladie, cette classe d'allèle constituant un trait dominant de protection contre la maladie. Cette vision est confortée par la mise en évidence d'un effet protecteur variable en fonction de certains sous-groupes de classe III. Cet effet protecteur pourrait être lié au niveau d'expression du gène de l'insuline dans le thymus [Jolicoeur, 1994]. En effet, il a été montré que l'insuline est exprimée dans le thymus chez l'homme comme chez la souris, et que le niveau d'expression du gène est sous la régulation du VNTR, avec 2 à 3 fois plus d'ARN messager (ARNm) du gène *INS* chez les sujets porteurs des allèles de classe III que chez les sujets porteurs des allèles de classe I. L'effet protecteur pourrait alors s'expliquer par une meilleure délétion intrathymique des clones T autoréactifs ou par une sélection positive de cellules régulatrices CD4+ $CD25^{high}$. A cet égard, l'étude d'un modèle murin dans lequel l'expression thymique de l'insuline est progressivement réprimée montre une corrélation inverse entre la concentration thymique d'insuline et la réactivité lymphocytaire T contre cet autoAg en périphérie [Chentoufi, 2002]. Enfin, l'absence d'expression de la pro-insuline 2 conduisant à une accélération de la maladie chez les souris NOD/pro-insuline $2^{-/-}$ conforte le rôle de l'expression thymique de l'insuline dans la susceptibilité au diabète [Thebault-Baumont, 2003]. Quoiqu'il en soit, le VNTR de l'insuline constitue le candidat fonctionnel le plus probable au niveau du *locus IDDM2* et pourrait agir en modifiant l'accessibilité des régions en 5' du gène, aux molécules régulant son expression [Lucassen, 1995 ; Kennedy, 1995 ; Bennett, 1995].

C- Autres polymorphismes géniques des autoantigènes

D'autres exemples du rôle du polymorphisme de l'autoAg ont été découverts au cours de MAI non spécifiques d'organe. Le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) est caractérisé par la production d'Ac dirigés contre des structures phospholipidiques anioniques (cardiolipine, phosphatidylsérine) qui nécessitent pour se fixer à leur ligand, la présence d'un cofacteur protéique, notamment la β2-glycoprotéine I (β2-GPI). Or, 2 études cas-témoins ont montré qu'il existe une corrélation entre le polymorphisme valine/leucine en position 247 du gène de la β2-GPI et la production d'Ac anti- β2-GPI chez les patients présentant un SAPL [Atsumi, 1999 ; Hirose, 1999]. Le polymorphisme Valine^{247} pourrait intervenir de différentes façons, soit qu'il modifie des déterminants peptidiques de la molécule qui peuvent alors être apprêtés par des CPA et présentés par les molécules de classe II du CMH, soit qu'il modifie l'affinité de la β2-GPI pour les phospholipides et ainsi la constitution des complexes β2-GPI/phospholipides reconnus par les Ac. De même, une association entre le génotype C/T d'un *single nucleotide polymorphism* (SNP) situé dans l'intron 3 du gène *Ro52* et la présence d'Ac anti-Ro52 kD dans le syndrome de Sjögren a été démontré [Nakken, 2001]. Enfin, nous avons identifié un polymorphisme de la desmogléine 1 associé à la survenue du pemphigus que nous décrirons plus bas.

V. EPISSAGE ALTERNATIF ET ISOFORMES D'AUTOANTIGENES

Malgré de significatifs progrès, les mécanismes par lesquels les protéines du soi rompent la tolérance immune et deviennent la cible des effecteurs auto-immuns sont encore mal compris. Depuis une dizaine d'années, plusieurs travaux ont montré l'implication du phénomène d'épissage alternatif des autoAg au cours des MAI spécifiques et non spécifiques d'organe. Ce processus met en jeu des changements dans le choix des sites d'épissage qui peuvent aboutir à des modifications diverses des transcrits et donc, des protéines qu'ils codent. Le plus généralement, la conséquence de l'épissage alternatif consiste en l'inclusion d'une portion de séquence codante dans les ARNm matures aboutissant à la synthèse d'isoformes protéiques, dont la séquence aminoacide et les propriétés biochimiques sont modifiées [Black, 2003]. Les analyses bio-informatiques estiment qu'environ 42% des 60000 gènes que contient le génome humain peuvent subir un épissage alternatif [Ng, 2004]. L'épissage alternatif est donc un mécanisme crucial par lequel un nombre restreint de gènes peut générer la grande complexité du protéome humain, estimé de 9.10^4 à 1.10^6 protéines [Stamm, 2002]. Etant donné que la majorité du processus d'épissage alternatif (70% à 88%) affecte des régions codantes des ARNm [Modrek, 2002], les répercutions de ce phénomène au niveau immunologique peuvent être multiples. A cet égard, une vingtaine d'autoAg ont été décrits à ce jour comme subissant un épissage alternatif avec ou sans la

démonstration de la production d'un variant protéique, suggérant que ce mécanisme contribue à la régulation de leur expression (Tableau 8) [Mouquet, manuscrit en préparation]. Différents travaux montrent l'implication directe des transcrits alternatifs/isofomes d'autoAg dans les processus d'auto-immunité et font l'objet d'un développement dans cette partie.

Tableau 8. Exemples d'autoantigènes subissant un épissage alternatif

Autoantigènes	**Isoformes/Transcrits alternatifs**	**Maladies associées**
NOR-90	*ND*	MAI systémiques
tNASP (testiculaire)	sNASP (somatique)	Vasectomie
PLP	DM20	SEP
SmB/B´	SmB´ aORF	LED
Ro52	Ro52β (p52-2)	LED
La/SS-B	*ND*	LED/Syndrome de Sjögren
ICA512 (IA-2)	ICA512Δ13 / ICA512Δ14	Diabète de type 1
MBP (21, 5 kDa)	20, 2 kDa MBP / 18,5 kDa MBP / 17,3 kDa MBP	SEP
Lamine A/C	Lamine AΔ10	Granulomatose de Wegener
Topoisomérase IIα-1	Topoisomérase IIα-2 / IIα-3 / IIα-4	Morphée
Antigène de Goospasture	*ND*	Syndrome de Goodspature
Fogrine (IAR PTP)	*ND*	Diabète de type 1
Golgine 67	*ND*	Syndrome de Sjögren/LED
NuMA	NuMA-m (U4/p195) / NuMA-s (U6/p194)	Syndrome de Sjögren
Protéine du réseau *trans*-Golgien p230	Clones λ7 / λ8 / Y1	Syndrome de Sjögren
BPAG1e	BPAG1n / BPAG1a / BPAG1b	Pemphigoïde bulleuse
αII spectrine (α-fodrine)	αIIσ2- / αIIσ3- / αIIσ4-spectrine	Syndrome de Sjögren
RA33 (hnRNP A1)	hnRNPB1	PR
ICAp69	ICAp69β / ICAp69γ	Diabète de type 1
TPO	TPO2 / TPO3 / TPO2-3 / TPO4 / TPO2-4 / TPO5 / TPO6	Thyroïdite auto-immune
Thyroglobuline	*ND*	Thyroïdite auto-immune
IGRP	*G6PC2*Δ4 / *G6PC2*Δ3-4 / *G6PC2*Δ2-3 / *G6PC2*Δ2-4 / *G6PC2*Δ2-3-4	Diabète chez la souris NOD

NOR90, *90-kDa nucleolus organizer region autoantigen* ; NASP, *nuclear autoantigenic sperm protein* ; PLP, *proteolipid protein* ; ICA512, *islet cell antigen 512* ; MBP, *myelin basic protein* ; IAR PTP, *islet cell antigen-related protein-tyrosine phosphatase* ; NuMA, *nuclear mitotic apparatus protein* ; BPAG1e, *epidermal bullous pemphigoid antigen 1*; ICAp69, *islet cell antigen p69* ; hnRNP, *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* ; TPO, *thyroperoxydase. ND*, non dénommé. IGRP, *islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein.*

A- L'épissage alternatif des transcrits codant des autoantigènes est fréquent [Ng, 2004]

Une récente étude *in silico* a démontré que le taux de transcrits immatures subissant un épissage alternatif est de 100% pour les messagers codant des autoAg (n=45) et de seulement 41% pour ceux codant des protéines humaines sélectionnées au hasard (n=50). L'épissage alternatif de ces transcrits d'autoAg utilisent pour 80% d'entre eux, des sites d'épissage non-canoniques ne respectant pas la règle GT—AG caractéristique des séquences d'épissage consensus qui sont employées dans 99% des cas pour l'épissage des messagers correspondant à des gènes sélectionnés au hasard (Figure 4). Par ailleurs, les auteurs montrent que les séquences spécifiques des isoformes d'autoAg générées par épissage alternatif correspondent en majorité (77%) à des sites de modifications post-traductionnelles des protéines qui seraient susceptibles d'accroître l'immunogénicité des autoAg.

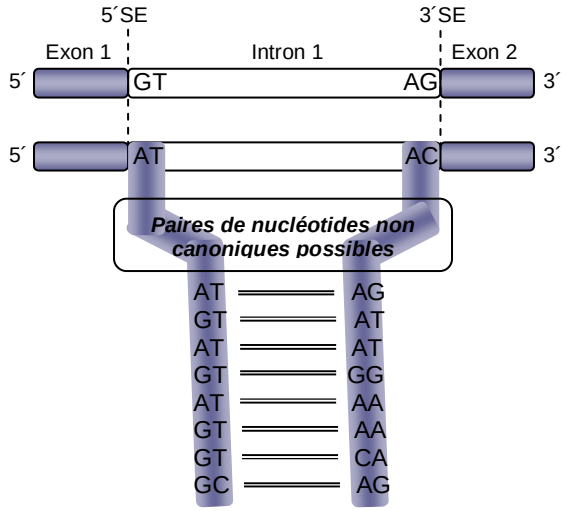


Figure 4. Epissage canonique et non canonique des transcrits immatures. L'épissage dit canonique utilise les sites d'épissage aux extrémités 5´ et 3´ de l'intron correspondant aux séquences flanquantes GT–AG. Cet épissage canonique représente plus de 99% de l'épissage de transcrits sélectionnés au hasard. Lorsque l'épissage n'utilise pas les séquences introniques consensus GT–AG, il est qualifié de non canonique et rend compte de moins d'1% de l'épissage. SE, site d'épissage.

Actuellement, on connaît une vingtaine d'autoAg pour lesquels des messagers alternatifs ont été mis en évidence (Tableau 8) [Mouquet, manuscrit en préparation]. Des mécanismes moléculaires distincts peuvent intervenir dans l'épissage alternatif de ces transcrits d'autoAg (Figure 5) et conduire dans certains cas, à des modifications structurales qui affectent les propriétés biochimiques, la localisation, la fonction ou encore l'expression et l'accessibilité des autoAg (Tableau 9). Sur un plan immunologique, l'épissage alternatif peut par exemple être à la base de l'expression de nouveaux déterminants antigèniques vis à vis desquels les cellules T en différenciation dans le thymus ne sont tolérisées, créant ainsi une rupture potentielle de la tolérance immunitaire. En effet, l'introduction de séquences exoniques par ce mécanisme peut aboutir à la production de séquences peptidiques d'une taille suffisante (8 à 15 aminoacides) pour être reconnues par des autoAc et/ou pour être apprêtées par les molécules du CMH de classe I et de classe II et constituer ainsi de nouveaux épitopes

spécifiques de récepteur lymphocytaire T. De plus, ces modifications pourraient altérer ou *a contrario* augmenter l'immunogénicité des autoAg et par conséquent, contribuer au processus physiopathologique des MAI.

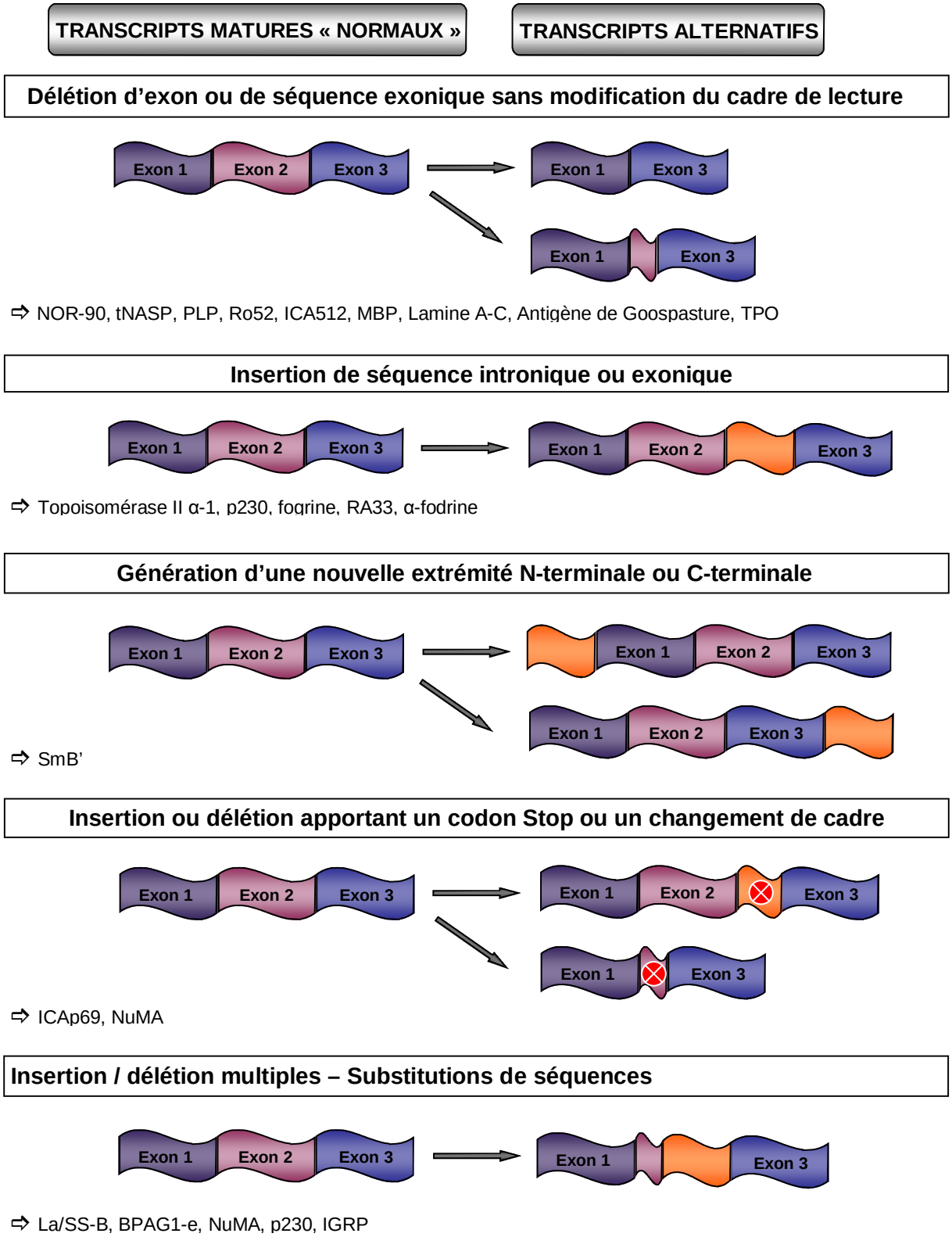


Figure 5. Mécanismes d'épissage alternatif des autoantigènes.

Tableau 9. Modifications des autoantigènes induites par épissage alternatif

Modifications	**Isoformes/Transcrits alternatifs**	**Autoantigènes**	**Maladies auto-immunes**
PHYSIOLOGIQUE			
Perte de la localisation subcellulaire	Ro52β	Ro52	LED
	ICA512Δ13	ICA512	Diabète de type 1
	NuMA-m, NuMA-s	NuMA	Syndrome de Sjögren
Expression augmentée (1) ou diminuée (2)	Topoisomérase IIα-4 (1)	Topoisomérase IIα-1	Morphée
	sNASP (1)	tNASP	Vasectomie
	TPO2 (2)	TPO	Thyroïdite auto-immune
Génération de nouveau domaine d'interaction	αIIσ3 et αIIσ4 spectrines	αII spectrine	Syndrome de Sjögren
	BPAG1n / BPAG1a / BPAG1b	BPAG1e	Pemphigoïde bulleuse
Perte de l'activité enzymatique	TPO2	TPO	Thyroïdite auto-immune
IMMUNOLOGIQUE			
Expression thymique de l'autoAg restreinte à un variant alternatif	DM20	PLP	EAE/SEP
	ICA512Δ13	ICA512	Diabète de type 1
	ND	Thyroglobuline	Thyroïdite auto-immune
	*G6PC2*Δ2/3/4	IGRP	Diabète chez la souris NOD
Création de néo-épitope cible de la réponse T	X2MBP	MBP	SEP
Génération potentielle d'épitopes B	ICA512Δ13	ICA512	Diabète de type 1
	Ro52-kD	Ro52β	LED
	SmB/B´	SmB´ aORF	LED
Perte potentielle ou avérée d'épitopes T ou B	*ND*	Antigène de Goospasture	Syndrome de Goospasture
	ICA512Δ13	ICA512	Diabète de type 1
	DM20	PLP	EAE/SEP
	Ro52-kD	Ro52β	LED

NASP, *nuclear autoantigenic sperm protein* ; ICA512, *islet cell antigen 512* ; NuMA, *nuclear mitotic apparatus protein* ; BPAG1, *bullous pemphigoid antigen 1*; ICAp69, *islet cell antigen p69* ; hnRNP, *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* ; TPO, *thyroperoxydase* ; MBP, *myelin basic protein* ; PLP, *proteolipid protein* ; IGRP, *islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein* ; LED, lupus érythémateux disséminé ; SEP, sclérose en plaque ; EAE, encéphalomyélite allergique expérimentale.

B- Des isoformes d'autoantigènes à l'origine d'une rupture de la tolérance centrale ?

Plusieurs travaux ont montré que l'expression thymique d'un autoAg, ciblé par la réponse auto-immune au cours de MAI, est restreinte à un messager alternatif susceptible de produire une isoforme protéique tronquée. Ainsi, l'épissage alternatif des autoAg pourrait constituer un mécanisme moléculaire à la base d'une rupture de la tolérance au soi qui favoriserait l'émergence de lymphocytes T autoréactifs, non tolérisés vis à vis d'épitopes exclusivement présents sur la forme complète d'un autoAg exprimée en périphérie, dans l'organe ciblé par la réponse auto-immune.

La PLP, principalement exprimée dans le système nerveux central, est un composant de la gaine myéline qui est ciblé par la réponse auto-immune au cours de la SEP. Les ARNm immatures de la PLP peuvent subir un épissage alternatif qui aboutit à l'élimination de l'exon 3b (105 pb) codant pour un domaine en boucle de la PLP [Nave, 1987]. L'isoforme protéique générée par ce mécanisme, appelée DM20, est aussi exprimée dans le système nerveux central bien que plus faiblement comparée à la forme complète de la protéine. Klein *et al* en 2000 ont montré que l'expression dans le thymus de la PLP est largement restreinte à son isoforme DM20, la forme complète n'y étant pas exprimée [Klein, 2000]. Ces résultats suggèrent donc que la tolérance lymphocytaire T vis à vis de la PLP est limitée aux épitopes présents sur le variant DM20, excluant ceux contenus dans la boucle de la PLP (35 aminoacides), absente du thymus. Par conséquent, les cellules T spécifiques d'un épitope de cette boucle pourraient échapper à la tolérisation intrathymique et gagner la périphérie. Les auteurs ont confirmé cette hypothèse par l'étude de la réponse lymphocytaire T dans 2 lignées de souris immunisées avec la PLP : les souris SJL, porteuses de l'haplotype du CMH $H2^S$ et caractérisées par susceptibilité accrue à l'induction de l'EAE, et les souris BL/6 d'haplotype $H2^b$. La comparaison entre les 2 lignées montre que seules les souris SJL développent une réponse T dirigée contre un épitope (139-151) présent sur la boucle de la PLP, les molécules $H2^S$ étant capables d'accommoder le peptide 139-151 [Klein, 2000]. L'exclusion de cette épitope immunodominant des mécanismes de tolérance centrale chez les souris SJL permet d'expliquer pourquoi les cellules T autoréactives dirigées contre la boucle de la PLP ne sont pas purgées du répertoire et donc, jouent un rôle clé dans le développement de l'EAE chez ces animaux. Chez l'homme, l'expression thymique de la PLP est aussi restreinte à son isoforme DM20 et puisque des réponses T sont dirigées contre des épitopes situés dans le domaine en boucle de la PLP [Markovic-Plese, 1995 ; Trotter, 1998], le phénomène décrit expérimentalement chez la souris pourrait rendre compte de la rupture de la tolérance contre la PLP humaine (Figure 6).

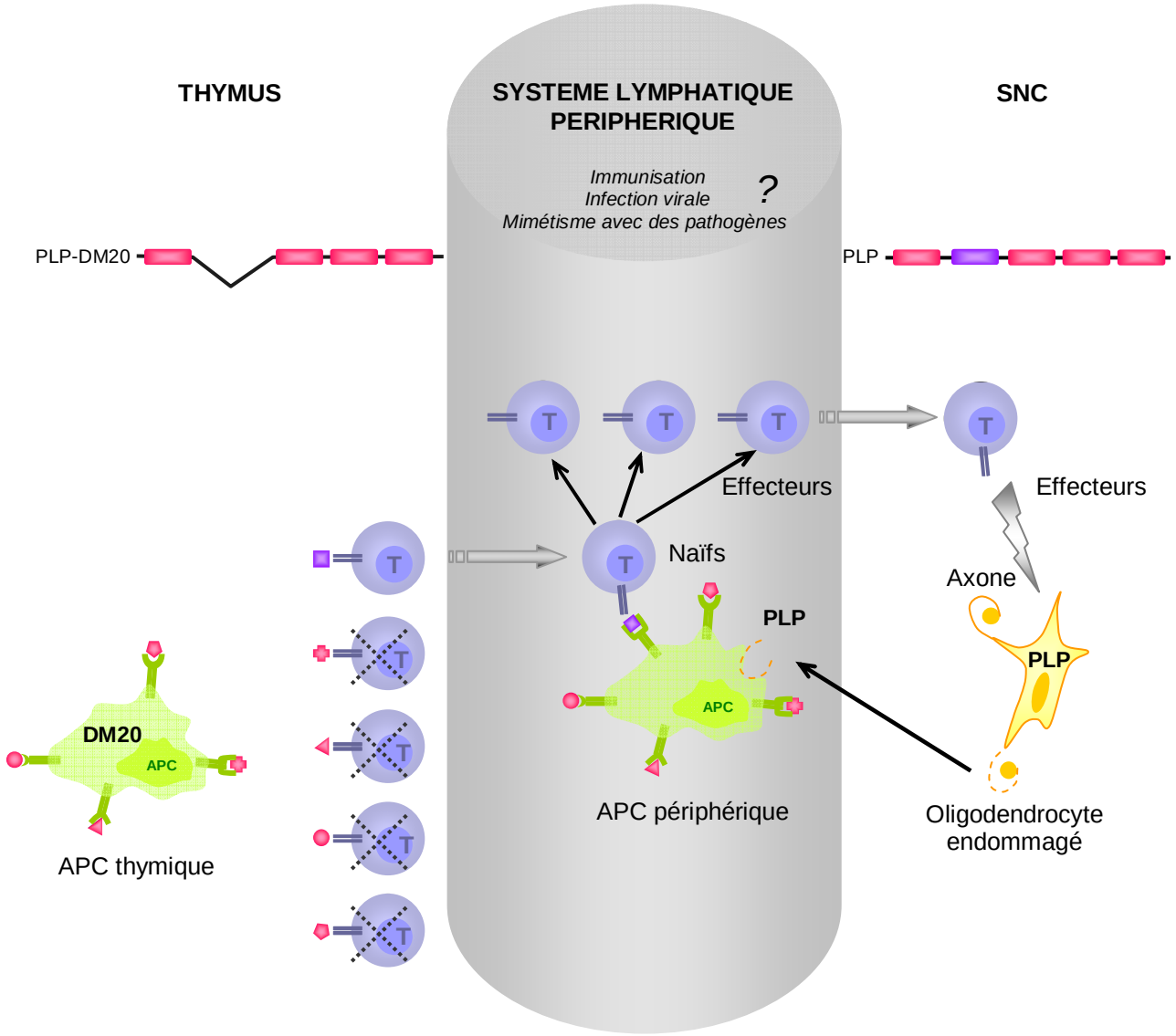


Figure 6. Mécanisme proposé pour expliquer le processus auto-immun médié par la PLP. Les cellules T immatures spécifiques des épitopes portés par la PLP-DM20 (rose) sont éliminées dans le thymus tandis que les cellules T dirigées contre la région en boucle de la PLP (violet), absente de la PLP-DM20, ne sont pas délétées et migrent à la périphérie. Les peptides de la PLP, incluant la région en boucle, sont présentés par des APC aux lymphocytes T non tolérisés. Les cellules T activées passent ensuite la barrière hémato-encéphalique et infligent des dommages aux oligodendrocytes exprimant la PLP. Au cours de l'EAE induite par la PLP, c'est l'immunisation qui conduit à l'activation initiale des cellules T autoréactives mais dans le cas de la maladie humaine, les événements à l'origine de cette activation ne sont pas encore connus. SNC, système nerveux central.

Un second exemple de l'expression différentielle d'un autoAg en périphérie et de son isoforme dans le thymus a été décrit pour l'Ag des îlots pancréatiques, ICA512 (ou IA-2). IA-2 est une protéine transmembranaire de type tyrosine phosphatase ciblée par la réponse autoAc au cours du diabète de type 1. Chez l'homme, deux transcrits alternatifs de cet autoAg ont été identifiés. Le premier variant, IA-2 Δ exon 13, est caractérisé par une délétion (219 pb) dans l'exon 13 qui code pour les domaines transmembranaire et juxtamembranaire de la protéine et le second, IA-2 Δ 14, par une délétion (129 pb) dans l'exon 14 qui code une partie du domaine intracellulaire. Les études montrent que les 3 types de messagers IA-2 sont présents dans les îlots pancréatiques mais que seul le transcrit alternatif IA-2 Δ exon 13 est exprimé dans le thymus et la rate [Diez, 2001]. Différents travaux ont montré l'existence d'une réponse auto-immune dirigée contre des épitopes contenus dans les domaines transmembranaire et juxtamembranaire d'IA-2 [Naserke, 1998 ; Bonifacio, 1998 ; Lampasona, 1996]. Puisque ces épitopes sont absents de la protéine IA-2 Δ exon 13, l'expression thymique restreinte à cette isoforme pourrait expliquer la rupture de la tolérance vis à vis de l'autoAg IA-2 au cours du diabète de type 1.

Un autre exemple est fournit par un autoAg cible de la réponse auto-immune chez la souris NOD, la protéine associée à la sous-unité catalityque de la glucose-6-phosphatase spécifique des cellules β des îlots pancréatiques (IGRP). Cette protéine est codée par le gène *G6PC2* qui posséde également 5 trancrits alternatifs caractérisés par des délétions exoniques. Les 6 transcrits *G6PC2* sont exprimés dans le pancréas en revanche, à l'exception du messager délété des exons 2, 3 et 4, les autres transcrits *G6PC2* ne sont pas ou peu exprimés dans le thymus et la rate [Dogra, 2006]. Bien que l'IGRP ne constitue qu'un autoAg candidat du diabète de type 1, on peut envisager que cette expression tissulaire différentielle entre le pancréas et le thymus puisse favoriser la survenue de réponses auto-immunes anti-IGRP chez l'homme.

Enfin, une étude montre que des transcrits de la thyroglobuline de souris comportant certains épitopes pathogéniques sont absents du thymus bien qu'ils soient exprimés dans les glandes thyroïdes de l'animal [Li, 2005]. Etant donné que les peptides correspondants sont capables d'induire une thyroïdite auto-immune expérimentale, l'épissage alternatif de la thyroglobuline dans le thymus pourrait aboutir à un défaut de tolérisation des lymphocytes T spécifiques de ces séquences.

C- La réponse auto-immune dirigée contre les isoformes d'autoantigènes générées par épissage alternatif

1/ UNE REPONSE LYMPHOCYTAIRE T DIRIGEE CONTRE DES EPITOPES SPECIFIQUES D'ISOFORMES D'AUTOANTIGENES : L'EXEMPLE DE LA MBP

L'étude *in silico* citée précédemment montre que les séquences peptidiques spécifiques des isoformes d'autoAg peuvent constituer des épitopes T potentiellement ciblés par la réponse auto-immune. En effet, 92% de ces isoformes d'autoAg contiennent dans leurs séquences spécifiques des épitopes T CD8+ restreints aux molécules HLA-A2.1 et 88% des épitopes T CD4+ restreints aux molécules HLA-DR4. Différents travaux expérimentaux corroborent les résultats obtenus par ces analyses bio-informatiques. En effet, l'existence d'une réactivité lymphocytaire T dirigée contre des épitopes spécifiques d'une isoforme d'autoAg a été démontrée dans la SEP. Quatre isoformes de la MBP, autoAg cible de la réponse auto-immune au cours de la maladie, ont été décrites chez l'homme. Ces isoformes possèdent des poids moléculaires différents ; 21,5 kDa, 20,2 kDa, 18,5 kDa et 17,3 kDa, les 3 dernières étant générées par épissage alternatif [Roth, 1987]. La MBP de 18,5 kDa est codée par des transcrits alternatifs caractérisés par une délétion de l'exon 2 et, constitue l'isoforme majoritairement exprimée dans le système nerveux central humain et la mieux étudiée en terme de réponse lymphocytaire T chez les malades. A l'instar, les transcrits codant pour les MBP de 20,2 kDa et 21,5 kDa contiennent l'exon 2 et ont une expression augmentée lors des processus de remyélinisation [Jordan, 1990]. Voskuhl *et al* ont démontré l'existence de lymphocytes T CD4+ dirigés spécifiquement contre le peptide encodée par l'exon 2 (X2MBP), restreints par les molécules HLA de classe II et capables de fonction effectrice cytotoxique [Voskuhl, 1993a]. Plus précisément, l'analyse de la réponse lymphocytaire T à l'aide de clones spécifiques de X2MBP isolés chez les malades de SEP, a montré que celle-ci est restreinte à l'allèle HLA DR2/DQw1 qui est associé à la maladie. De plus, les clones T ayant une spécificité commune semblent utiliser préférentiellement certains segments VDJ codant pour le TCR [Voskuhl, 1994]. Les auteurs montrent par ailleurs que la fréquence de clones T spécifiques de X2MBP, isolés chez les membres d'une famille multiplexe atteints de SEP, est corrélée à la gravité de la maladie [Voskuhl, 1993b]. Bien que les souris SJL/J immunisées avec le peptide X2MBP ne développent qu'une EAE modérée, les clones T anti-X2MBP isolés chez ces souris sont capables d'induire une EAE sévère lorsqu'ils sont transférés à des receveurs syngéniques [Segal, 1994 ; Fritz, 1994]. Puisque des cellules T spécifiques de X2MBP sont aussi détectées chez les sujets sains, leur présence n'est pas suffisante pour développer la maladie mais pourrait cependant, contribuer à sa progression. En effet, l'expression potentiellement

augmentée des isoformes contenant la séquence encéphalitogène X2MBP, due au processus de remyélinisation qui accompagne l'accumulation des lésions chez les patients caractérisés par une maladie avancée, pourrait entretenir la réponse auto-immune.

2/ LA REACTIVITE AUTOANTICORPS CONTRE LES ISOFORMES D'AUTOANTIGENES

Les analyses bio-informatiques montrent que les régions spécifiques des isoformes d'autoAg contiennent pour 70% d'entre-elles, un ou plusieurs épitopes candidats capables de fixer des autoAc. Toutefois, aucune démonstration formelle notamment, par une étude fine de la cartographie épitopique B, n'a été apportée expérimentalement dans le but de corroborer l'existence d'une réactivité autoAc dirigée contre un néo-épitope porté par une isoforme d'autoAg. Les différentes études décrivent soit une perte d'antigénicité *via* la suppression de séquences comportant des épitopes initialement ciblées par les autoAc soit, la persistance d'une réponse B contre des épitopes communs à l'autoAg et son isoforme respective. A cet égard, il est intéressant de mentionner que le criblage de banque d'expression d'ADNc avec les sérums de malades atteints de MAI a abouti à la découverte de transcrits alternatifs pour plusieurs autoAg tels que les protéines SS-A/Ro52-kDa [Chan, 1991] et SS-B/La [Tröster, 1994] ou encore la protéine p230 du réseau *trans*-golgien [Tsukada, 2000].

La réactivité autoAc dirigée contre des isoformes générées par épissage alternatif a été clairement mise en évidence pour les autoAg SS-A/Ro52-kD et ICA512/1A-2, qui sont respectivement les cibles de la réponse auto-immune B au cours du LED et du diabète de type 1. Le criblage d'une banque d'expression d'ADNc de cellules MOLT-4 a permis l'isolement d'un clone immunoréactif (p52-2) correspondant à un variant alternatif de l'Ag SS-A/Ro52-kD [Chan, 1991]. Ce transcrit est caractérisé par une délétion de 231 pb correspondant à l'exon 4 du gène *RO52* qui une fois traduit, aboutit à la synthèse d'une isoforme protéique notamment exprimée dans le coeur, Ro52β, délétée du domaine leucine *zipper* [Chan, 1995]. L'absence de ce domaine leucine *zipper* nécessaire aux interactions avec d'autres protéines mais aussi avec l'ADN induit très probablement une perte de fonctions et de localisation subcellulaire de l'isoforme Ro52β. Bien que cette région leucine *zipper* contienne des épitopes B ciblés au cours du LED, l'analyse de la réactivité autoAc montre que 87% des sérums de mères dont les enfants sont atteints de lupus néonatal (n=30) sont capables d'immunoprécipiter la protéine Ro52β recombinante alors que la forme canonique Ro52α n'est reconnue que dans 50% des cas. Cette isoforme pourrait donc exprimer des néo-épitopes provenant soit de la réunion de séquences dûe à la délétion de l'exon 4, soit du changement ou de la perte de conformation protéique. On peut

émettre l'hypothèse que l'altération du domaine impliquée dans la localisation cellulaire de l'Ag SS-A/Ro52-kD pourrait aboutir à une désequestration moléculaire de la protéine Ro52β alors susceptible de rompre la tolérance au soi.

Un exemple très proche de celui décrit ci-dessus est illustré par l'isoforme de l'autoAg ICA512/1A-2. Park *et al* ont identifié un transcrit alternatif (clone ICA512.bdc) caractérisé par la délétion de l'exon 13 du gène *ICA512/1A-2* codant pour les domaines transmembranaire et juxtamembranaire de la protéine [Park, 2000]. L'isoforme synthétisée à partir de ce transcrit, IA-2 Δ exon 13**,** est probablement soluble et sécrétée par les cellules β du pancréas. Bien que des épitopes portés par le domaine juxtamembranaire réagissent avec les autoAc au cours du diabète de type 1, son élimination de la protéine IA-2 Δ exon 13 n'abolit pas la réactivité Ac vis à vis de cette isoforme. De manière intéressante, une population d'autoAc semble cibler spécifiquement la forme tronquée d'ICA512/1A-2 (3 à 6% des patients) probablement au niveau de néo-épitopes générés par la jonction des exons 12 et 14. Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, seule la forme IA-2 Δ exon 13 est exprimée dans le thymus, ce qui conduirait à « l'échappement » de clones T non tolérisés vers la périphérie. Dans les organes lymphoïdes, cette isoforme soluble pourrait transiter par la voie sécrétoire avant d'être apprêtée et présentée par les molécules du CMH portées par les CPA qui auraient alors la capacité d'induire l'activation de cellules T autoréactives à potentiel lésionnel.

Enfin, la seule preuve directe de la présence d'autoAc dirigés contre un néo-épitope B vient de la production d'un néo-autoAg par épissage alternatif qui initialement ne constitue pas une cible au cours de la PR. Tanaka *et al* ont en effet montré l'existence d'une isoforme tronquée de la sous-unité β (gp130) du récepteur à l'IL6 caractérisée par l'addition à son extrémité C-terminale d'un oligopeptide absent sur la forme transmembranaire de la protéine gp130. Cette isoforme soluble et plus précisément la séquence C-terminale de 15 acides aminés est reconnue par les autoAc présents chez 75% des patients atteints de PR [Tanaka, 2000].

A côté de ces démonstrations qui confirment que des variants alternatifs peuvent constituer des cibles de la réponse lymphocytaire B, il faut néanmoins préciser que le mécanisme d'épissage alternatif peut conduire à l'élimination d'épitopes spécifiques des formes canoniques d'autoAg ciblées au des MAI spécifiques et non spécifiques d'organe et donc, à une diminution de l'antigénicité (Tableau 9).

Au vu des différentes études sur les transcrits alternatifs/isoformes d'autoAg, plusieurs conclusions peuvent être formulées sur l'implication du mécanisme d'épissage alternatif des autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune.

Premièrement, au niveau central, l'expression thymique exclusive d'une isoforme délétée d'une séquence portée par l'autoAg présent en périphérie peut conduire à un défaut de la sélection intrathymique à l'origine de l'émergence de clones T autoréactifs à la périphérie. De plus au niveau périphérique, différents phénomènes illustrant les possibilités de modification des autoAg par épissage alternatif pourraient rendre compte de la rupture de la tolérance au soi : (i) la création de néo-épitopes T ou B ; (ii) la meilleure accessibilité d'isoformes ayant perdu les séquences nécessaires à leur localisation cellulaire vis à vis du système immunitaire en d'autres termes, la désequestration anatomique de l'autoAg ; (iii) la surexpression d'une isoforme par rapport à l'autoAg sous sa forme canonique. A cet égard, Zinkernagel *et al* ont suggéré que la surexpression des Ag du soi ou la création de nouvelles structures antigéniques permet de franchir le seuil de la concentration en Ag nécessaire à l'initiation de la réponse immune [Zinkernagel, 2001]. Ainsi, les changements induits par l'épissage alternatif des autoAg *via* la production d'isoformes protéiques aux propriétés modifiées semblent-ils vraiment participer à l'initiation de la réponse auto-immune au cours des MAI spécifiques et non spécifiques d'organe.

Pour conclure sur le rôle de l'autoAg dans les processus auto-immuns, l'un des aspects les plus importants concernant les mécanismes de l'auto-immunité est de connaître la nature de l'Ag initiateur de la réponse auto-immune. Cela n'est pas sans soulever certaines difficultés. Il n'est pas aisé de déterminer si les autoAc et les Ag correspondants ont une relation avec le mécanisme pathogène d'une MAI. A cet égard, il est important et intéressant de pouvoir disposer de modèles expérimentaux. Une deuxième difficulté réside dans le fait que les MAI s'accompagnent, dans la majorité des cas, d'une production de multiples autoAc dirigés contre divers Ag de l'organe cible, ce qui rend difficile l'identification de l'autoAg initiateur. Il n'en demeure pas moins que la démonstration du rôle de l'autoAg comme élément initiateur et pérennisateur de la réponse auto-immune, à la fois dans les MAI spécifiques d'organe et non spécifiques d'organe semble clairement établie et que l'étude des modifications de l'Ag lui même dans sa structure, sa localisation, sa ditribution cellulaire constitue des voies de recherche très intéressantes pour comprendre les processus d'auto-immunité mis en oeuvre.

Chapitre 3 : Le Desmosome

La cohésion interkératinocytaire est fondamentale pour l'organisation et le maintien de l'architecture de la peau et donc pour les fonctions de l'épiderme. Les cellules épithéliales et les kératinocytes sont interconnectés par trois types de structure jonctionnelle : les jonctions d'ancrage, incluant les desmosomes et les jonctions adhérentes; les jonctions serrées; et les nexus (ou *gap-junctions*). Les jonctions d'ancrage permettent le pontage entre des molécules d'adhésion transmembranaires exprimées à la surface cellulaire et le cytosquelette (microfilaments d'actine pour les jonctions adhérentes et filaments intermédiaires de kératine pour les desmosomes).

Les mécanismes d'adhésion cellulaire assurent en générale deux fonctions distinctes ; l'attachement d'une cellule à une autre ou à la matrice extracellulaire et, la transduction de signaux qui régulent la survie et/ou le phénotype cellulaire. Ainsi, les desmosomes qui représentent la structure adhésive majeure des kératinocytes, garantissent-ils l'intégrité de l'épiderme par leur fonction d'adhésion intercellulaire, fournissant une solidité structurale *via* l'ancrage du réseau de filaments intermédiaires entre deux cellules voisines mais aussi par la régulation de nombreux phénomènes biologiques tels que la croissance et la différenciation cellulaire.

I. L'ULTRASTRUCTURE DU DESMOSOME (Figure 7)

Dans l'épiderme, les desmosomes apparaissent comme des ponts entre kératinocytes notamment au niveau des couches épineuses et granuleuses qui en sont enrichies. En microscopie électronique à transmission, ils forment des structures discoïdes de 0,1 à 0, 5 µm de diamètre, présentes uniquement sur la membrane des kératinocytes, et qui sont constituées de deux plaques cytoplasmiques et symétriques, appartenant aux deux cellules adjacentes et d'une région centrale extracellulaire appelée desmoglie. La desmoglie (30 nm d'épaisseur), dans laquelle on distingue une ligne extracellulaire dense, est prise en sandwich entre deux plaques desmosomales, qui sont localisées à proximité de la membrane plasmique et dans lesquelles viennent s'insérer les filaments intermédiaires du cytosquelette. La plaque desmosomale est une région dense aux électrons, de 14 à 20 nm d'épaisseur, dans laquelle on distingue une plaque externe (très dense) et une plaque interne (moins dense).

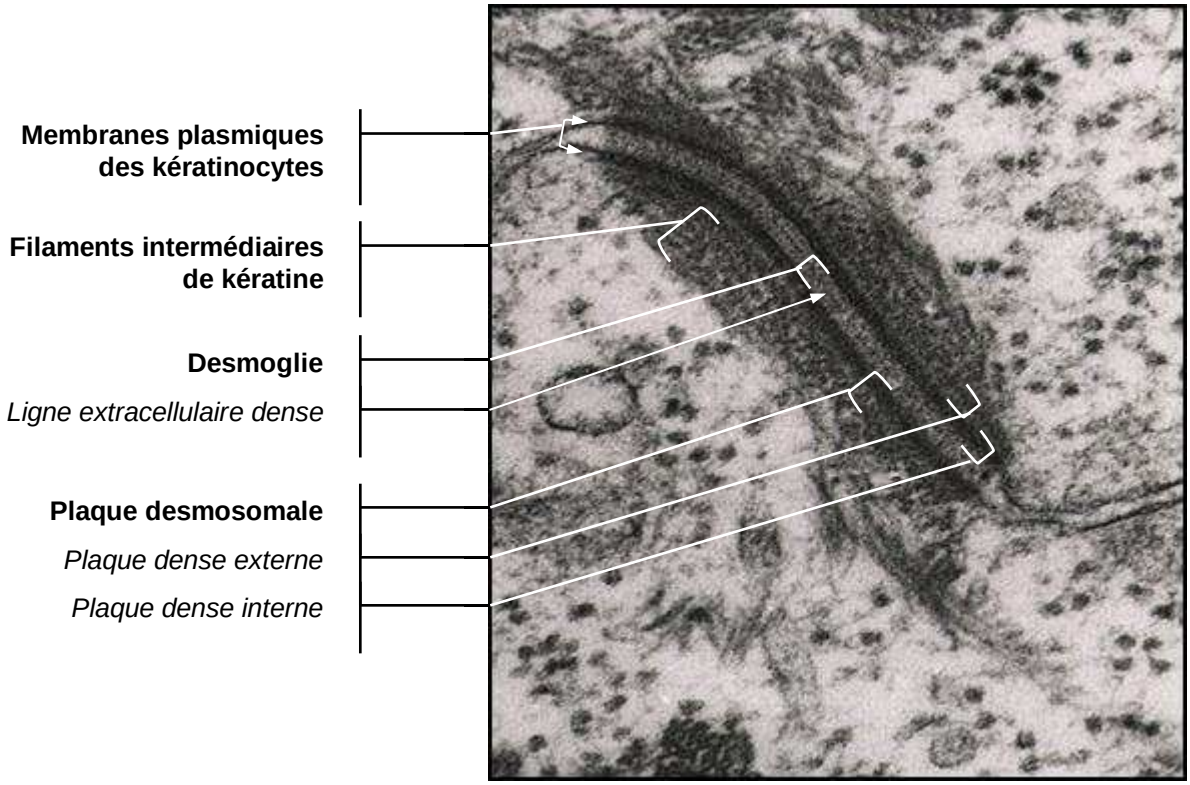


Figure 7. Ultrastructure du desmosome. Le desmosome assure l'adhésion cellulaire entre deux kératinocytes adjacents. En microscopie électronique, le desmosome prend l'aspect d'une structure discoïde constituée de deux plaques cytoplasmiques et symétriques, appartenant aux deux cellules adjacentes, appelées plaques desmosomales et d'une région centrale extracellulaire appelée desmoglie. Des filaments intermédiaires de kératine s'insèrent dans la plaque desmosomale qui est composée d'une plaque dense interne et d'une plaque dense externe. On distingue dans la partie centrale de la desmoglie, une ligne extracellulaire dense.

II. LA STRUCTURE MOLECULAIRE DU DESMOSOME (Figure 8)

Le desmosome est un complexe multimoléculaire qui comprend des protéines de trois différentes familles : les cadhérines desmosomales, les plakines et des protéines *armadillo*. La partie N-terminale des molécules transmembranaires d'adhésion de la superfamille des cadhérines, principalement les desmogléines et les desmocollines, constitue la desmoglie. La partie C-terminale de ces deux protéines clés est implantée dans la plaque dense externe qui contient les protéines *armadillo*, plakoglogine et plakophiline, ainsi que la portion N-terminale des desmoplakines. La partie C-terminale de ces dernières s'étend à travers la plaque dense interne où elle se fixe aux filaments intermédiaires de kératine. Les desmoplakines comme la plectine fonctionnent comme des adaptateurs moléculaires permettant la fixation des filaments de kératine aux extrémités intracellulaire des cadhérines desmosomales et constituent des prototypes de la famille des plakines. Deux autres membres, l'envoplakine et la périplakine, originellement décrites comme des constituants de l'enveloppe cornée de l'épiderme, sont aussi des plakines présentes dans le desmosome.

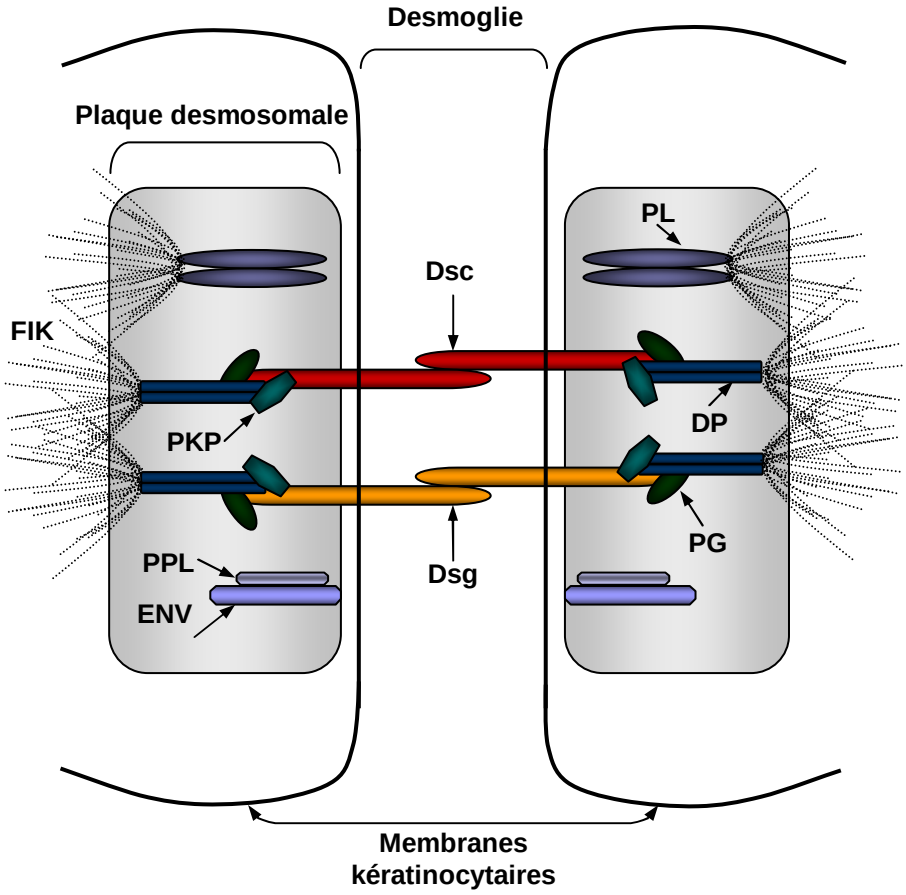


Figure 8. Organisation moléculaire du desmosome. Le desmosome est un complexe multimoléculaire qui est constitué, d'une part, de glycoprotéines transmembranaires appartenant à la famille des cadhérines desmosomales (les desmogléines (**Dsg**) et les desmocollines (**Dsc**)) qui forment la desmoglie et, d'autre part, de protéines cytosoliques ; les plakines (les desmoplakines (**DP**), la plectine (**PL**), l'envoplakine (**ENV)** et la périplakine (**PPL**)) et les protéines *armadillo* (la plakoglobine (**PG**) et les plakophilines (**PKP**) qui forment la plaque desmosomale. Les cadhérines desmosomales interagissent : (i) entre-elles par leur extrémité N-terminale, (ii) avec la PG et les DP par leur domaine cytosolique. Les filaments intermédiaires de kératines (**FIK**) sont fixés à la plaque desmosomale via des interactions avec les DP et la PL.

A- Les cadhérines desmosomales

Les cadhérines représentent une superfamille de protéines d'adhésion cellulaire calcium-dépendantes initialement décrites comme sensibles à la dégradation trypsique bien que résistantes à cette protéolyse en présence de calcium. Ces protéines transmembranaires sont classées en 5 sous-familles dont 2 majeures, les cadhérines classiques et les cadhérines desmosomales qui sont respectivement impliquées dans l'adhésion cellulaire médiée par les jonctions adhérentes et les desmosomes. Le groupe des cadhérines desmosomales comporte 2 membres, les desmocollines (Dsc) et les desmogléines (Dsg). Ces glycoprotéines interagissent entre elles dans l'espace interkératinocytaire et avec certaines protéines de la famille plakine et *armadillo* qui composent la plaque desmosomale.

1/ LA STRUCTURE MOLECULAIRE (Figure 9)

Les différents membres appartenant à la superfamille des cadhérines possèdent une organisation moléculaire commune avec une structure primaire très similaire. Chaque molécule est composée dans l'orientation N- à C-terminale, des séquences signal et propeptide à l'extrémité N-terminale du précurseur inactif, d'une région extracellulaire,

d'une portion transmembranaire et d'une région intracytoplasmique comprenant notamment un domaine très conservé entre les cadhérines. La région extracellulaire des cadhérines matures, qui renferment plusieurs motifs de fixation du calcium (DXD et DXNDN), est constituée de cinq domaines équivalents d'environ 100 aminoacides chacun dont les 4 premiers sont homologues et forment des unités répétitives de type cadhérines. Les extrémités N-terminales de la région extracellulaire (EC) de deux molécules interagissent entre-elles de manière homotypique et calcium-dépendante pour assurer la fonction d'adhésion des cadhérines, détaillée ci-dessous [Amagai, 1995c].

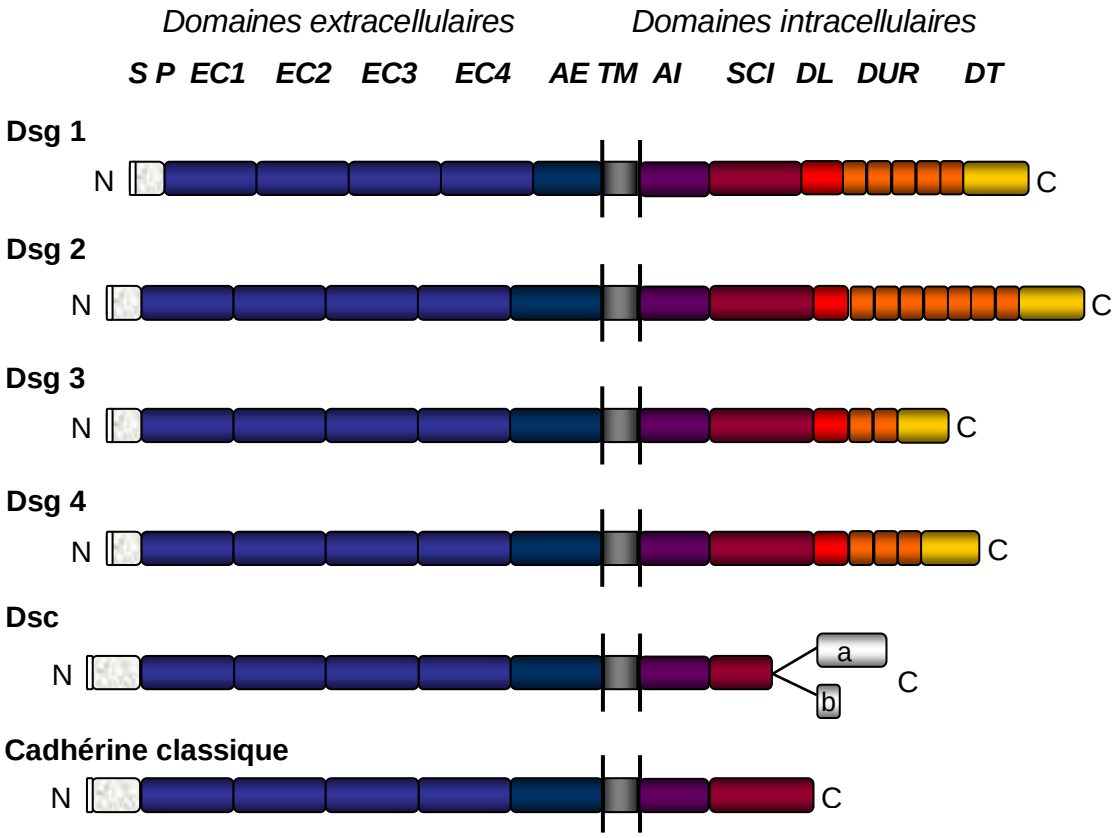


Figure 9. Structure des cadhérines desmosomales. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires synthétisées sous forme de précurseur inactif, possédant un peptide signal (**S**) et une proséquence (**P**) qui est clivée au cours de leur maturation. Les cadhérines sont composées de 4 domaines extracellulaires (**EC**), d'un domaine ancrage extracellulaire (**AE**) ou EC5, d'une région transmembranaire (**TM**), d'un domaine d'ancrage intracellulaire (**AI**) et d'un domaine très conservé dans la région cytosolique (**SCI** ; segment cadhérine intracellulaire). La région intracellulaire des Dsg contient en plus, un domaine de liaison riche en proline (**DL),** un domaine d'unités répétées (**DUR**) de 29 ± 1 résidus, caractéristiques de ces protéines ainsi qu'un domaine C-terminal (**DT**). Chaque isotype de Dsc possèdent un domaine C-terminal spécifique **a** ou **b**, dérivé d'un épissage alternatif.

2/ LA FONCTION D'ADHESION

Comme les cadhérines classiques, les cadhérines desmosomales possèdent dans leur domaine extracellulaire EC1, des sites de reconnaissance d'adhésion cellulaire (CAR). Ces sites CAR correspondent à des tripeptides avec une alanine en position centrale. Ils diffèrent selon les isoformes de Dsc (YAT pour la Dsc1, FAT pour la Dsc2 et YAS pour la Dsc3) et sont identiques pour l'ensemble des Dsg (RAL) [Garrod, 1996]. L'importance de ces sites a été confirmée par une étude sur des fibroblastes transfectés par des cadhérines desmosomales, qui a montré l'inhibition de l'adhésion par des peptides dérivés des séquences CAR des Dsc1 et Dsg1 [Tselepis, 1998]. Les mécanismes moléculaires précis impliqués dans l'adhésion des cadhérines ont été illustrés par de nombreux modèles qui sont encore actuellement débattus [Troyanovsky, 2005]. Il est cependant généralement admis que les cadhérines adhèrent entre-elles par des interactions entre leurs domaines EC1. Plus précisément, les analyses cristallographiques sur les cadhérines classiques ont montré que leur dimérisation nécessite l'insertion réciproque du résidu tryptophane 2 (Trp^2) du domaine EC1 dans une poche hydrophobe du domaine EC1 complémentaire [Shapiro, 1995; Boggon, 2002] (Figure 10*A*). Les cadhérines pourraient alors former des dimères entre 2 molécules antiparallèles qui s'assembleraient de la sorte en un filament (Figure 10*B*). L'existence de dimères formés par des interactions *trans* entre 2 cadhérines voisines est encore controversée. Néanmoins, une étude par tomographie électronique sur des coupes de peau de souris a révélé l'organisation du desmosome *in situ*. En effet, l'élaboration d'une carte en 3D a permis de montrer que les molécules de cadhérines forment des groupes discrets par interaction de leur extrémité N-terminale (Figure 10*C*). La flexibilité de cette interface d'adhésion serait médiée par les échanges intermoléculaires de résidu Trp^2 et conduirait à la génération d'interactions *cis* et *trans* entre les cadhérines pouvant se propager le long de la jonction (Figure 10*D*) [He, 2003]. A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur l'adhésion des cadhérines desmosomales. Une récente étude *in vivo* a néanmoins montré par immunomicroscopie électronique directe, que le domaine EC1 de la Dsg3 murine est localisé au niveau de la ligne extracellulaire dense du desmosome, c'est à dire dans la partie médiane de la desmoglie [Shimizu, 2005].

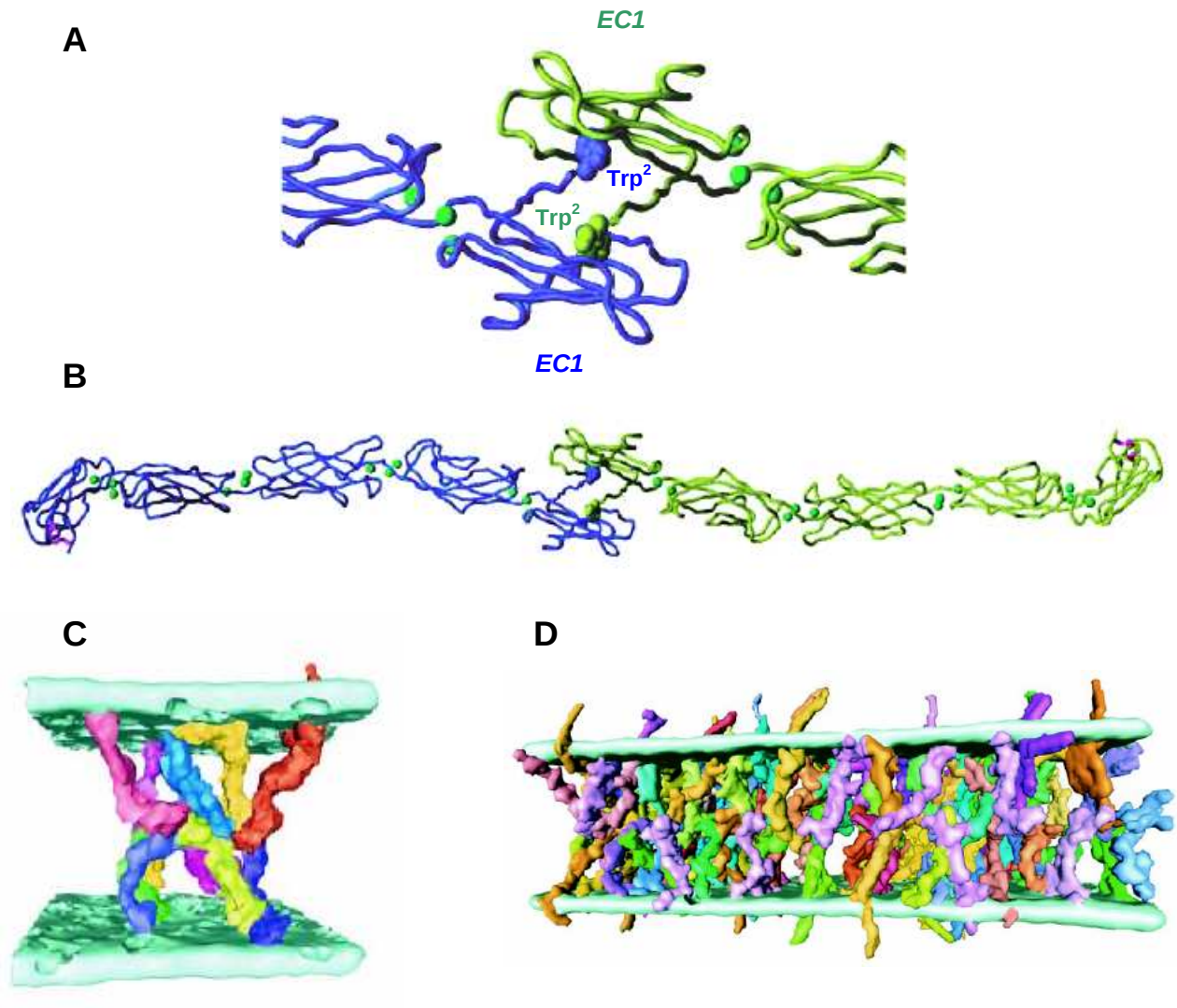


Figure 10. Représentation moléculaire de l'interface d'adhésion entre les domaines extracellulaires des cadhérines classiques. Les analyses cristallographiques montrent que les domaines extracellulaire EC1 des cadhérines classiques interagissent entre eux par l'insertion réciproque du résidu Trp^2 (EC1) dans une poche hydrophobe du domaine EC1 complémentaire (A). Le dimère formé entre 2 molécules antiparallèles s'assemble alors en un filament (B). L'analyse *in situ* des desmosomes de la peau de souris par tomographie électronique a permis l'élaboration d'une carte en 3D montrant que les molécules de cadhérines forment des groupes moléculaires par interaction de leur extrémité N-terminale (C). La génération d'interactions *cis* et *trans* entre les cadhérines dûes à des échanges intermoléculaires de résidu Trp^2 pourraient se propager le long de la jonction et aboutir ainsi, à la formation d'une interface d'adhésion flexible (D).

3/ L'EXPRESSION TISSULAIRE

Les Dsg2 et Dsc2 ont une expression ubiquitaire et sont détectées dans tous les tissus contenant des desmosomes incluant les épithéliums simples tels que ceux du colon et de l'intestin grêle, et les tissus non épithéliaux comme le myocarde ou encore les follicules des ganglions lymphatiques. Au contraire, les Dsc3, Dsg3, Dsc1 et Dsg1 ont une expression restreinte aux tissus épithéliaux stratifiés comme l'épiderme et les muqueuses [Schäfer, 1994 ; Nuber, 1995]. Dans l'épiderme, la Dsg1 est exprimée selon un gradient croissant des couches profondes vers les couches les plus superficielles de l'épiderme

alors que la Dsg2 et la Dsg3 présentent une expression restreinte aux kératinocytes des couches basales. Dans les muqueuses, la Dsg3 est fortement exprimée à travers tout l'épithélium tandis que l'expression de la Dsg1 est plus modérée et semble absente des couches basales [Amagai, 1996; Shirakata, 1998]. Des travaux récents montrent que la Dsg4 est principalement exprimée dans les couches granulaires de l'épiderme et à travers tout l'épithélium muqueux excepté au niveau des couches basales [Mahoney, 2006]. Il nécessaire de préciser que bien qu'elles soient caractérisées par des profils d'expression distincts, les Dsg1, Dsg3 et Dsg4 sont aussi présentes dans le follicule pileux [Hanakawa, 2004 ; Mahoney, 2006].

4/ LES DIFFERENTS MEMBRES

Les desmogléines

Les Dsg sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1, calcium-dépendantes, qui appartiennent à la famille des cadhérines desmosomales. Chez l'homme, il existe 4 isoformes de Dsg (Dsg1 à Dsg4) codées par des gènes distincts localisés sur le chromosome 18q12.1, regroupés au sein d'un segment génique de 250 kb et arrangés dans le sens 5´-cen-*DSG1-DSG4-DSG3-DSG2*-Tel.3´ (Figure 11) [Kljuic, 2003 ; Whittock, 2003b]. Chez la souris, les homologues sont au nombre de six, le complexe génique occupant alors environ 400 kb [Whittock, 2003a]. Les séquences et l'organisation des gènes codants les différentes isoformes sont très conservées entre-elles (Tableau 10), mais aussi entre l'homme et la souris.

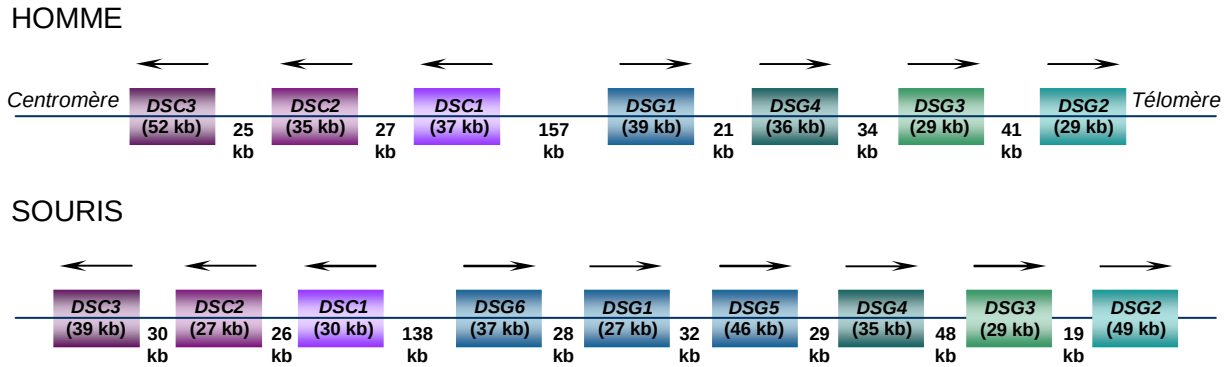


Figure 11. Organisation génomique des cadhérines desmosomales.

Tableau 10. Comparaison des séquences aminoacides entre les desmogléines humaines

Id/Hom	Dsg1	Dsg2	Dsg3	Dsg4
Dsg1		34/47	41/55	38/52
Dsg2	34/47		36/53	36/51
Dsg3	41/55	36/53		46/62
Dsg4	38/52	36/51	46/62	

L'identité (Id) et l'homologie (Hom) entre les Dsg sont exprimées en %.

Par ailleurs, les comparaisons géniques entre les deux espèces ont montré que la Dsg5 murine correspondrait véritablement à l'homologue de la Dsg1 humaine et que les gènes codant les Dsg1 et Dsg6 chez la souris auraient été éliminés au cours de l'évolution [Whittock, 2003a]. Chez l'homme, 15 exons composent les gènes *DSG1* (Figure 12) et *DSG2* et 16 exons, les gènes *DSG3* et *DSG4.*

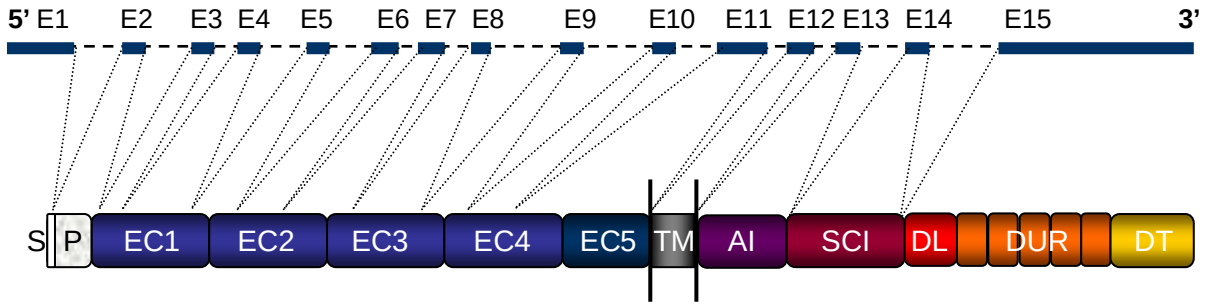


Figure 12. Structures génique et protéique de la desmogléine 1. Le gène *DSG1*, localisé entre le gène *DSG4* et le *cluster* génique des Dsc, est composé de 15 exons (E) et couvre une région génomique d'environ 40 kb. Les introns sont représentés par des lignes pointillées. La Dsg1 (160 kDa) comprend de son extrémité N- à C-terminale : un peptide signal suivi d'un propeptide ; une région extracellulaire composée de 5 domaines (EC1 à EC5) ; un domaine transmembranaire (TM) ; une région intracellulaire composée d'un domaine ancrage intracellulaire (AI), d'un segment des cadhérines intracellulaire, d'un domaine de liaison riche en proline (DL**),** un domaine de 5 unités répétées de 29 ± 1 résidus (DUR) et d'un domaine C-terminal (DT).

L'organisation protéique des Dsg est similaire à celle des autres cadhérines. Elles sont composées d'une région extracellulaire organisée en 5 domaines (EC1 à EC5), d'un segment transmembranaire et d'une région intracytoplasmique (Figure 9). Cependant, elles diffèrent des autres membres de la famille, puisque la région intracellulaire des Dsg contient en plus, un domaine de liaison riche en proline (DL), un domaine d'unités répétées (DUR) de 29 ± 1 résidus, caractéristiques de ces protéines ainsi qu'un domaine C-terminal (DT).

Ces protéines adhèrent entre-elles dans l'espace interkératinocytaire ou desmoglie par des interactions homotypiques (interactions entre protéines homologues) de leur domaine extracellulaire EC1. Plusieurs travaux ont démontré l'existence d'interactions hétérophiliques avec les Dsc (domaines EC1 et EC2) se traduisant par la formation de dimère Dsg/Dsc [Chitaev, 1997]. Ces interactions qui font intervenir les domaines EC1-EC2 des Dsc et les domaines EC1-EC2-EC3 des Dsg sont dépendantes du Ca^{2+} et semblent indispensables à l'adhésion intercellulaire médiée par le desmosome [Chitaev, 1997]. Les interactions entre ces molécules sont certainement plus complexes et diversifiées. Le modèle d'une interface d'adhésion flexible formée par des groupes d'interaction moléculaire, décrite pour les cadhérines classiques est une hypothèse qui pourrait rendre compte de la multiplicité des associations entre cadhérines

desmosomales [He, 2003]. La queue cytoplasmique des Dsg est liée directement aux desmoplakines (protéine de la famille des plakines) qui se fixent elles-mêmes au cytosquelette de kératine, ou indirectement par l'intermédiaire de protéines de la famille *armadillo* (plakoglobine et plakophiline) (Figure 8) [Bornslaeger, 2001]. La plus récente étude montre que la plakoglobine peut se complexer à 2 molécules de Dsg1 et à 1 molécule de Dsg2 ou de Dsg3 [Bannon, 2001].

Les desmocollines

Les Dsc, comme des Dsg, sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 qui appartiennent à la famille des cadhérines desmosomales. Trois isoformes de Dsc (Dsc1 à Dsc3) ont été isolées, chacune étant codée par des gènes distincts qui sont localisés sur le *locus* des cadhérines du chromosome 18q12.1, en 3´ des gènes *DSG*. Deux formes de la protéine, une forme longue « a » (17 exons) et une forme courte « b » (16 exons), peuvent être générées à partir d'un même transcrits de Dsc par épissage alternatif de l'extrémité C-terminale du domaine intracellulaire (élimination de l'exon 17) (Figure 9). Seule la queue cytoplasmique des formes longues de Dsc (Dsc1a, Dsc2a et Dsc3a) contient les séquences nécessaires aux interactions avec les desmoplakines et les protéines *armadillo*. La Dsc3a aurait toutefois la capacité de s'associer à la plakophiline 3 [Bonne, 2003]. Leur fixation avec les desmoplakines directement ou *via* la plakoglobine conduit, comme dans le cas des Dsg, au pontage d'une portion de leur domaine intracellulaire au cytosquelette du kératinocyte.

B- Les plakines [Leung, 2002; Jefferson, 2004]

La famille des plakines comprend un ensemble de protéines intracellulaires dites adaptatrices qui assure dans les épithéliums, la connexion entre les complexes jonctionnels et le cytosquelette. Chez les mammifères, 12 protéines distinctes ont été identifiées dont certaines représentent les isoformes protéiques des 7 membres actuellement individualisés. Dans l'épiderme, 7 plakines épithéliales permettent la liaison entre les jonctions intercellulaires ou cellules – matrice et les filaments intermédiaires de kératine : les desmoplakines I et II, la plectine, la protéine BPAG1 (antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse), la périplakine, l'envoplakine, et l'épiplakine (Figure 10). Les protéines BPAG1 et plectine pontent les filaments intermédiaires aux hémidesmosomes tandis que les desmoplakines lient ces filaments aux cadhérines desmosomales. La périplakine et l'envoplakine sont exprimées dans la couche cornée de l'épiderme dans laquelle elles prennent part à son assemblage. Enfin, une nouvelle plakine a été récemment identifiée, l'épiplakine, dont la fonction reste encore à définir. Qualifiées de « *cytolinker* », ces véritables « Goliath » assurent, de par cette fonction d'ancrage, la liaison

entre les jonctions cellulaires et le cytosquelette contribuant ainsi, à l'intégrité structurale des kératinocytes.

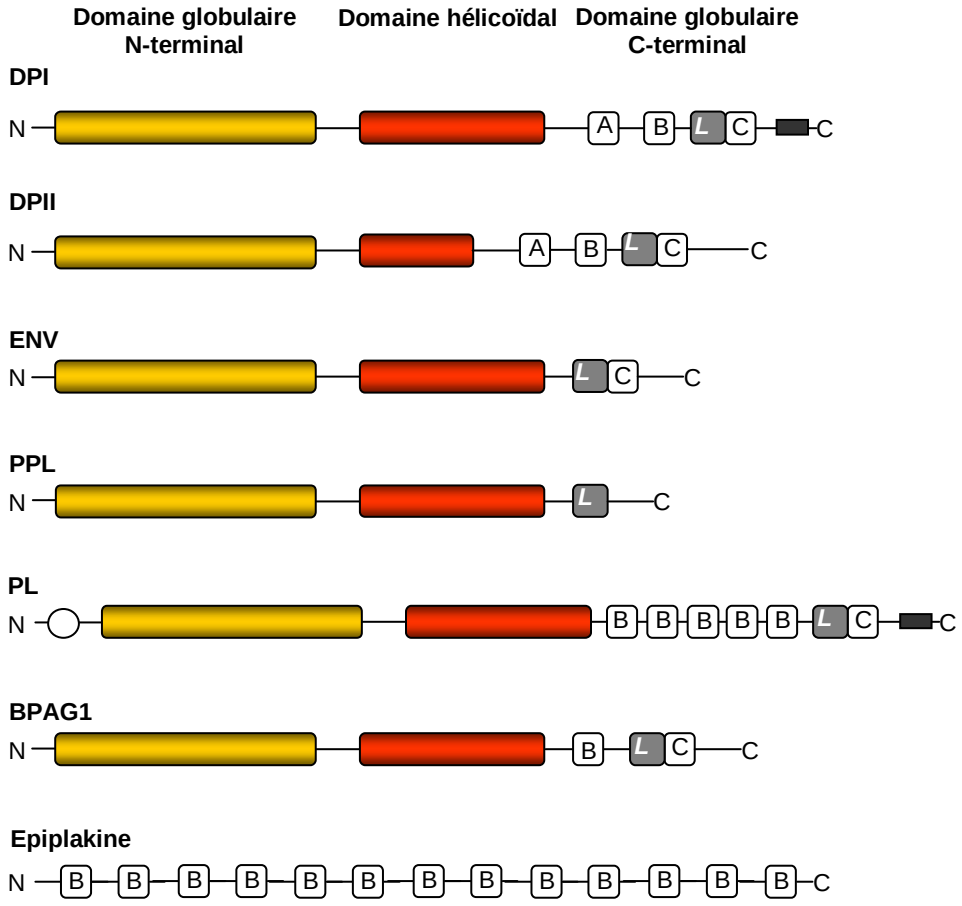


Figure 13. Structure des plakines. Sept plakines, présentes dans l'épiderme, assurent la liaison entre les jonctions d'ancrage (desmosomes et hémidesmosomes) et les filaments intermédiaires de kératine ; les desmoplakines I (**DPI**) et II (**DPII**), l'envoplakine (**ENV**), la périplakine (**PPL**), l'épiplakine, l'antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse (**BPAG1**) et la plectine (**PL**). Les plakines partagent une structure commune faite de deux domaines globulaires N- et C- terminaux séparés par un domaine central hélicoïdal (ou *rod domain*). Le domaine N-terminal nommé domaine plakine est constitué d'hélices α antiparallèles. Le domaine C-terminal est composé d'un nombre variable de répétions de type plakine (A, B ou C), qui sont conservées au sein de la famille et qui sont absentes de la structure des PPL. Le domaine central permet une homodimérisation par la formation d'une double hélice α. Dans leur domaine C-terminal, les desmoplakines possèdent un domaine supplémentaire, riche en glycine, sérine et arginine (domaine GSR) (■) et qui est commun à celui de la PL. Cette dernière contient à son extrémité N-terminale, un domaine d'ancrage à l'actine (domaine ABD) (○). L, sous domaine de liaison (ou *linker subdomain*).

1/ LA STRUCTURE MOLECULAIRE (Figure 13)

Les plakines possèdent une structure commune, organisée en 3 domaines : un domaine N-terminal globulaire dénommé domaine plakine qui est composé de 6 hélices α (NN, Z, Y, X, W et V) arrangées de manière antiparallèles pour former un faisceau α-hélicoïdal; un domaine central hélicoïdal assurant l'homodimérisation des plakines; un domaine C-terminal globulaire composé de nombreuses répétitions plakine (domaines PRD) de type A, B et C. Un sous domaine de liaison (*linker subdomain*) est localisé entre les répétitions B et C. L'extrémité C-terminale des desmoplakines et de la plectine contient un domaine supplémentaire, riche en glycine, sérine et arginine (domaine GSR). L'extrémité N-terminale de la plectine possède en plus, un domaine d'ancrage à l'actine (domaine ABD) correspondant à deux domaines d'homologie avec la calponine (domaine CH).

2/ LA FONCTION D'ANCRAGE

Les plakines sont fonctionnellement bivalentes car elles sont capables de se lier à la fois aux protéines de jonction cellulaire et aux filaments intermédiaires du cytosquelette. C'est le domaine plakine N-terminal qui est impliqué dans les associations avec les protéines jonctionnelles. Les partenaires d'interactions de ce domaine plakine ont été bien étudiés pour les plakines épithéliales et sont détaillés ci-dessous pour chacun des membres. Les filaments intermédiaires se fixent aux unités PRD (*Plakin-repeat domain*) du domaine globulaire C-terminal des plakines. Les études en cristallographie ont montré que la conformation des domaines PRD de type B et C consiste en une épingle β suivie par deux hélices α antiparallèles [Choi, 2002]. Cette structure possède les caractéristiques d'un site d'amarrage des filaments intermédiaires. De plus, le sous domaine *linker*, prédit pour former une hélice α, semble aussi impliqué dans la fixation de ces filaments aux desmoplakines [Fontao, 2003] et à la périplakine [Karashima, 2002].

3/ LES DIFFERENTS MEMBRES

Les desmoplakines

Les desmoplakines (DP), identifiées en 1974 à partir de fractions purifiées de plaques desmosomales [Skerrow, 1974] sont les plus abondants des composants desmosomaux. Elles sont indispensables au desmosome, sont essentielles au maintien de l'intégrité cellulaire et constituent le véritable prototype de la famille des plakines. Les deux isoformes de DP, DPI (250 kDa) et DPII (210 kDa), sont synthétisées par épissage alternatif. Une région de 599 aminoacides du domaine central hélicoïdal de la DPI est absente de la DPII (Figure 13) [Virata, 1992]. Les DP sont localisées dans la portion la plus interne de la plaque desmosomale où elles assurent l'ancrage des filaments

intermédiaires de kératine (qu'elles fixent par leurs domaines PRD) à la membrane plasmique. Elles s'associent généralement en dimère et interagissent avec les protéines armadillo (plakoglobine et plakophilines 1 et 2) par leur domaine plakine de même qu'avec la plectine. De plus, les DP se lient par leur domaine N-terminal à la région cytoplasmique des cadhérines desmosomales directement ou par l'intermédiaire des protéines *armadillo*, les couplant ainsi aux filaments intermédiaires du cytosquelette kératinocytaire (Figure 8). Les DP sont exprimés dans tous les types d'épithélium et sont aussi présentes dans certaines jonctions cellulaires autres que le desmosome.

La plectine

La plectine (protéine HD1 ou encore IFAP300) d'environ 500 kDa a originellement été copurifiée avec des préparations de filaments intermédiaires extraits de culture cellulaire [Pytela, 1980]. Cette phosphoprotéine intracellulaire d'expression ubiquitaire, exception faîte des neurones, est exprimée dans les plaques desmosomales mais aussi dans les plaques hémidesmosomales situées à la jonction dermoépidermique (Figure 14). Comparée aux autres plakines du desmosome, la plectine possède un domaine d'ancrage à l'actine (domaine ABD) à son extrémité N-terminale (Figure 13). Dans la plaque desmosomale, elle coopère avec les DP dans leur fonction de couplage des filaments intermédiaires aux desmosomes [Eger, 1997].

L'antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse, BPAG1

La protéine BPAG1 (BP230) a été caractérisée en 1981 par Stanley *et al*, comme une cible commune des autoAc présents chez les patients atteints de pemphigoïde bulleuse [Stanley, 1981]. Cette protéine de 230 kDa qui appartient à la famille des plakines, est exprimée dans l'épiderme et représente l'isoforme majeure du gène *BPAG1* (BPAG1-e), qui par des mécanismes d'épissage alternatif, code pour 4 différentes protéines [Leung, 2001]. Elle est synthétisée par les kératinocytes de la couche basale épidermique et est localisée dans la plaque hémidesmosomale interne où elle contribue à l'organisation du cytosquelette par la fonction de son extrémité C-terminale qui assure l'ancrage des filaments intermédiaires de kératine à la plaque hémidesmosomale. Une région N-terminale de BPAG1-e interagit avec les domaines intracytoplasmiques des protéines transmembranaires de l'hémidesmosome, l'intégrine α6β4 et la protéine BPAG2 [Mouquet, 2004] (Figure 14).

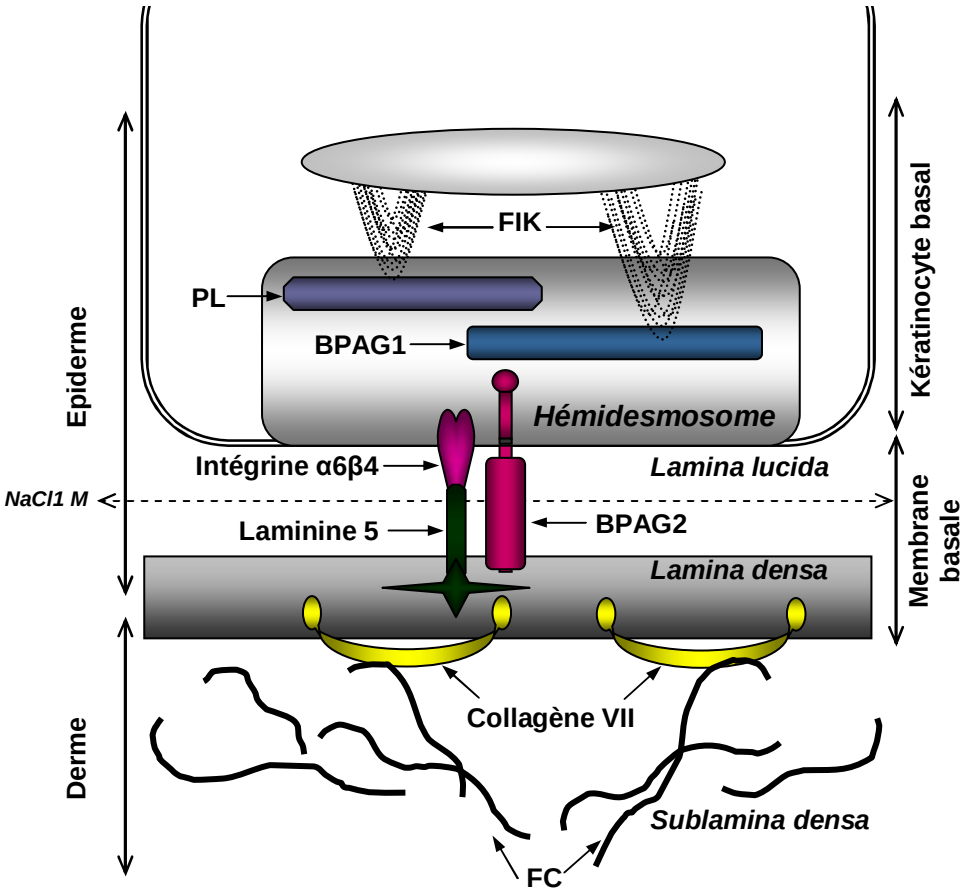


Figure 14. Organisation moléculaire de la jonction dermoépidermique. La jonction dermoépidermique constitue une zone d'adhésion entre l'épiderme et le derme. Cette adhésion est assurée par la triade ; hémidesmosomes, filaments d'ancrage et fibrilles d'ancrage. Les complexes hémidesmosomes/filaments d'ancrage permettent l'ancrage des kératinocytes basaux à la membrane basale composée de 2 lames ; la *lamina lucida* et la *lamina densa*. Les protéines intracellulaires **BPAG1** et plectine (**PL**), sont localisées dans la plaque hémidesmosomale interne et interviennent dans la fixation du cytosquelette (filaments intermédiaires de kératine (**FIK**)) aux hémidesmosomes. La PL et BPAG1 interagissent avec l'**intégrine α6β4** et avec la protéine **BPAG2**. Ces protéines transmembranaires ancrent les cellules basales au niveau de la plaque hémidesmosomale externe sur la membrane basale *via* leurs interactions avec la **laminine 5**, principale composante des filaments d'ancrage. Cette dernière interagit dans la *lamina densa* avec le **collagène de type VII**, constituant majeur des fibrilles d'ancrage, qui se projette dans une région dénommée *sublamina densa*, permettant ainsi la fixation de la membrane basale au derme sous-jacent. L'incubation de peau humaine avec une solution de NaCl 1 M provoque la séparation de l'épiderme du derme au niveau de la *lamina lucida*. **FC** : fibrilles de collagène.

L'envoplakine et la périplakine

L'envoplakine (ENV) de 210 kDa et la périplakine (PPL) de 190 kDa ont initialement été décrites comme des constituants de l'enveloppe cornée de l'épiderme [Ruhrberg, 1996 ; Ruhrberg, 1997]. Ces plakines sont exprimées dans des tissus épithéliaux complexes incluant des épithéliums squameux stratifiés non kératinisés mais pas dans les épithéliums simples, les tissus mésenchymateux ou le cœur. Elles sont toutefois

détectées dans l'épithélium pseudostratifié des glandes mammaires, l'épithélium transitionnel de la vessie et dans l'épithélium des muqueuses gastriques. Leur expression augmente avec la différenciation des épithéliums squameux stratifiés kératinisés tel que l'épiderme. Ni l'une ni l'autre ne sont des constituants obligatoires des desmosomes [Leung, 2002]. La région C-terminale de l'ENV ne contient qu'un seul domaine composé de répétitions plakine de type C et celle de la PPL, n'en possède aucun (Figure 13). L'ENV et la PPL peuvent former des homodimères et, peuvent interagirent entre-elles par leur domaine central pour former des hétérodimères [Ruhrberg, 1997]. Elles sont amarrées à la membrane plasmique par des transglutaminases durant la différenciation terminale des épithéliums stratifiés. Ces protéines sont impliquées dans l'échafaudage de la couche cornée bien que la PPL ne semble pas nécessaire à son assemblage [Maatta, 2001].

L'épiplakine

L'épiplakine a initialement été identifiée par le criblage d'une banque d'expression d'ADNc de kératinocytes humains avec le sérum d'un patient présentant une maladie bulleuse auto-immune et chez qui une réactivité autoAc dirigée contre une protéine inconnue de 450-kDa était détectée [Fujiwara, 1996]. Cette protéine de la famille des plakines est atypique puisqu'elle ne possède pas les domaines N-terminal globulaire et central hélicoïdal (Figure 13) [Fujiwara, 2001]. Elle est uniquement constituée de 13 répétitions hautement conservées de type B, dont les 5 derniers sont particulièrement homologues. Les analyses par *Northern blot* et par immunofluorescence indirecte montrent que l'épiplakine est largement exprimée dans différents tissus humains. Dans la peau, elle est présente au niveau de l'épiderme entier et pourrait participer à l'empaquetage des filaments intermédiaires de kératine.

C- Les protéines *Armadillo*

Les protéines de la famille *armadillo* (littéralement « tatou ») possèdent une fonction duale, de molécules d'adhésion et de signalement cellulaire. Elles sont caractérisées au niveau structural, par un domaine central, composé d'une série de répétitions de 42–45 acides aminés appelées répétitions *arm,* qui est impliqué dans les interactions protéine-protéine. Les protéines *armadillo* de la plaque desmosomale, la plakoglobine et les plakophilines, interagissent avec de nombreux partenaires desmosomiaux (Tableau 11).

Figure 11. Partenaires desmosomiaux d'interactions avec les protéines *Armadillo*

Protéines *Armadillo*	Protéines desmosomales
Plakoglobine	Dsg1, Dsg2, Dsg3 Dsc1a, Dsc2a DP PKP1, PKP2, PKP3
Plakophiline 1	Dsg1 Dsc1 DP
Plakophiline 2	Dsg1, Dsg2 Dsc1a, Dsc2a DP PG
Plakophiline 3	Dsg1, Dsg2, Dsg3 Dsc1a, Dsc2a, Dsc3a, Dsc3b DP PG

Dsg, desmogléine; Dsc, desmocolline; DP, desmoplakine; PG, plakoglobine; PKP, plakophiline.

La plakoglobine

La plakoglobine (PG) ou γ-caténine est une protéine de 83-kDa, non glycosylée et fortement basique, qui est localisée à la fois dans les plaques desmosomales et cytoplasmiques des jonctions adhérentes. Elle possède des fonctions d'adhésion et de signalement cellulaire qui s'avèrent cruciales pour l'assemblage et la stabilité du desmosome [Marcozzi, 1998]. Dans la plaque desmosomale, la PG se lie au niveau de ces répétitions *arm* à la queue cytoplasmique des cadhérines desmosomales, plus fortement aux Dsg qu'aux Dsc [Chitaev, 1996]. Elle se lie aussi au domaine N-terminal des DP [Kowalczyk, 1997] en association avec la plakophiline 1 [Bornslaeger, 2001] ainsi qu'aux filaments intermédiaires de kératine [Smith, 1998]. Sa fonction d'ancrage du cytosquelette aux cadhérines est indispensable à l'adhésion desmosomale.

Les plakophilines [Hatzfeld, 2006]

Les plakophilines (PKP) sont au nombre de 3, la PKP1 (75-kDa), la PKP2 (100-kDa) et la PKP3 (87-kDa). La PKP1 est majoritairement exprimée au niveau des couches suprabasales des épithéliums stratifiés tandis que la PKP2 et PKP3 sont présentes dans les épithéliums simples et stratifiés. Elles sont localisées dans la plaque desmosomale dans laquelle elles interagissent avec d'autres protéines desmosomales (Tableau 11), mais aussi dans le noyau des cellules épithéliales. Cette localisation intracellulaire mixte est en

accord avec leur intervention dans l'adhésion dépendante des desmosomes et dans les voies de signalisation. Les PPK ont été considérées comme des protéines accessoires de la plaque desmosomale contrairement à la DP et à la PG qui sont essentielles à la connexion entre desmosome et cytosquelette. Cependant, leur importance dans la formation de la plaque a récemment émergé. En effet, leurs nombreuses interactions (*via* leur domaine N-terminal) dans cette structure suggèrent qu'elles agissent comme des protéines « de coffrage » nécessaires à l'assemblage du desmosome. La PKP1, qui comme la PG est requise pour la formation des plaques, aurait un rôle de recrutement et de stabilisation des protéines desmosomales à la membrane plasmique [South, 2003]. La perte d'expression de la PKP1 affecte notamment la taille, le nombre et la stabilité des desmosomes. L'intervention des PKP2 et PKP3 dans la régulation de l'adhésion desmosomale semble plus discrète. La PKP2 a néanmoins une fonction majeure dans le transport de la DP à la membrane [Godsel, 2005]. Bien que les PKP ont aussi la capacité d'interagir *in vitro* avec les filaments de kératine, elles ne paraissent pas intervenir dans l'organisation du cytosquelette. Enfin, un nouveau membre de la famille des plakophilines, la PKP4 (ou protéine p0071), est aussi localisé dans les desmosomes de cellules épithéliales humaines. Elle peut interagir avec les cadhérines desmosomales ainsi qu'avec plusieurs protéines de la plaque (DP, PKP2 et PG) et son rôle dans l'adhésion kératinocytaire reste à déterminer.

Cette partie a été consacrée à la description des protéines qui participent à l'organisation moléculaire et à la fonction d'adhésion de la jonction desmosomale. Il est toutefois important de préciser que le desmosome intervient aussi dans la transduction de signaux cellulaires qui dans un souci de clarté, ne sera pas développée dans cette introduction. Le rôle de certaines protéines desmosomales dans le signalement kératinocytaire en particulier, la PG, sera tout de même évoqué dans la partie suivante.

Chapitre 4 : Les pemphigus

I. LES ASPECTS CLINIQUES ET HISTOLOGIQUES DES DIFFERENTES FORMES DE PEMPHIGUS

Les pemphigus sont des MAI spécifiques d'organe touchant la peau et les muqueuses. Ils se caractérisent par la production d'autoAc pathogènes dirigés contre des constituants du principal système de jonction interkératinocytaire : le desmosome. La fixation des Ac a pour conséquence la perte d'adhésion entre les kératinocytes appelée « acantholyse » et *in fine*, la formation de bulles intra-épidermiques [Mouquet, 2005].

La classification initiale des pemphigus repose sur la distinction entre deux grandes formes, en fonction de la profondeur du clivage intra-épidermique : les pemphigus profonds (pemphigus vulgaire et pemphigus végétant) comportant un clivage suprabasal et les pemphigus superficiels (pemphigus séborrhéique, pemphigus foliacé, pemphigus érythémateux, pemphigus endémique), comportant un clivage dans la couche granuleuse. Depuis les années 1970, de nouvelles formes de pemphigus ont été décrites, qui échappent à cette dichotomie : pemphigus paranéoplasique, pemphigus herpétiforme et pemphigus à IgA. Ainsi, si le diagnostic de pemphigus est souvent suspecté cliniquement, son affirmation nécessite la réalisation d'une biopsie cutanée ou muqueuse montrant un clivage intra-épidermique par acantholyse ainsi que des examens complémentaires pour la recherche des autoAc permettant d'affiner le diagnostic.

Les pemphigus endémiques brésilien et tunisien se rapprochent du pemphigus foliacé par leur présentation clinique et paraclinique. Ils sévissent avec une prévalence très augmentée et présentent des caractéristiques épidémiologiques très particulières. Les pemphigus brésilien et tunisien ainsi que le pemphigus endémique colombien seront davantage détaillés dans la partie consacrée aux facteurs environnementaux de la maladie.

Dans un souci de clarté, ne seront décrit dans cette partie que les 3 grandes variétés de pemphigus : le pemphigus vulgaire, le pemphigus foliacé et le pemphigus paranéoplasique.

A- Le pemphigus vulgaire, l'archétype des pemphigus profonds

Le pemphigus vulgaire (PV), décrit cliniquement par Willan en 1808 et Hebra en 1860, constitue la forme la plus fréquente de pemphigus avec plus de 70% des cas. Il reste malgré cela une maladie rare dont l'incidence est de 1 à 5 cas par million d'habitants et par an [Bastuji-Garin, 1995]. La maladie a été décrite dans toutes les ethnies mais sa fréquence est nettement plus élevée chez les Juifs Ashkénazes (16 à 32

cas par million d'habitants et par an) et au Japon. La maladie survient dans les deux sexes le plus souvent entre 40 et 60 ans mais des cas ont été décrits chez des enfants et chez des sujets plus âgés (de 18 mois à 89 ans).

Dans plus de deux tiers des cas, la maladie commence par une atteinte muqueuse qui est le plus fréquemment buccale (Figure 15*A*). L'atteinte des autres muqueuses est possible (atteinte œsophagienne [Joly, 1994], pharyngée, laryngée [Hale, 2001], génitale ou rectale [Sami, 2001a ; Wright, 2000] (Figures 15*B* et 15*C*). Le plus souvent, l'atteinte cutanée survient secondairement, plusieurs semaines ou plusieurs mois après les érosions muqueuses. Elle se caractérise par la survenue de bulles flaccides à contenu clair, siégeant classiquement en peau non érythémateuse (Figure 15*D*). Il existe un signe de Nikolsky en peau péri-bulleuse et parfois en peau saine (Figure 15*E*). Ce signe consiste en un détachement des couches superficielles de l'épiderme provoqué par le frottement appuyé de la peau.

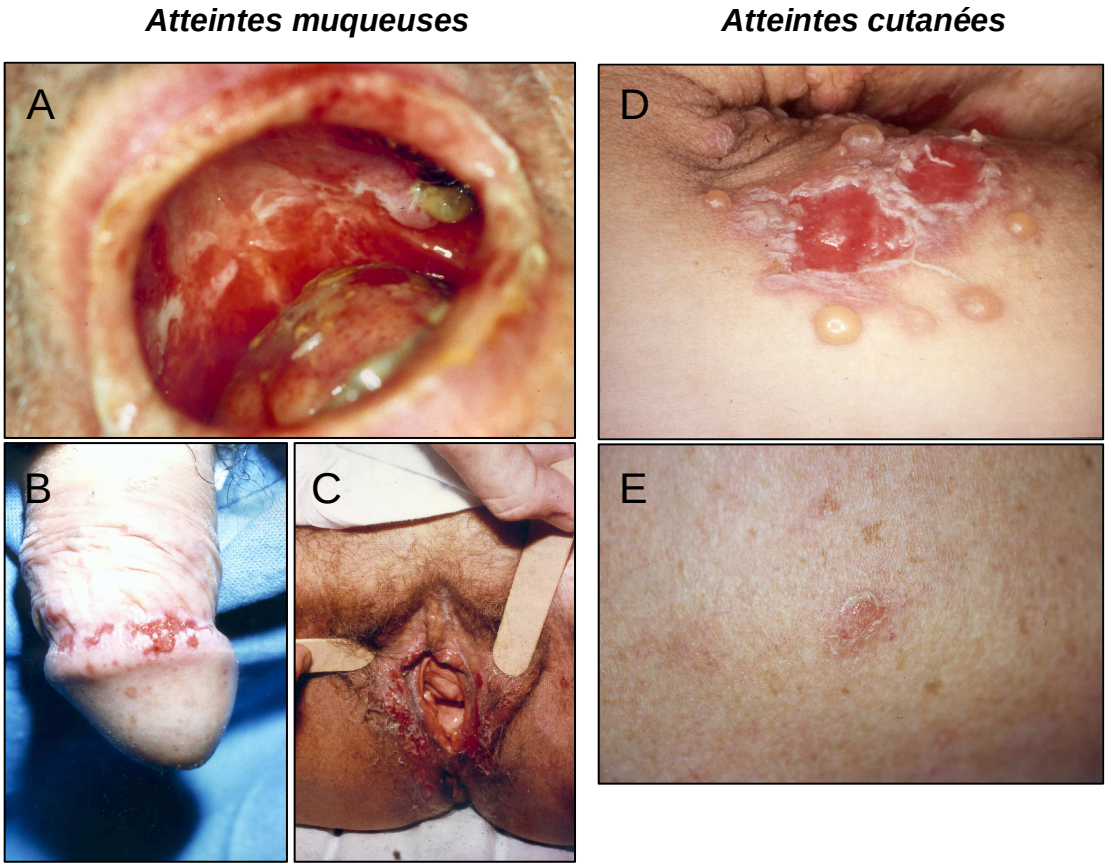


Figure 15. Lésions muqueuses et cutanées de pemphigus vulgaire. A, lésions endobuccales ; B, lésions balaniques ; C, lésions vaginales ; D, lésions cutanées avec un signe de Nikolsky positif (E).

L'examen en histologie standard d'une biopsie pratiquée au niveau d'une lésion bulleuse met en évidence un clivage intra-épidermique situé le plus souvent au-dessus de la couche basale de l'épiderme dont les kératinocytes sont également séparés les uns des autres, prenant un aspect en « pierre tombale » (Figure 16). Ce clivage est parfois visualisé au niveau des follicules pileux. Le liquide de bulle contient des cellules acantholytiques. Un infiltrat dermique mixte, le plus souvent modéré et composé de polynucléaires neutrophiles et/ou éosinophiles est souvent présent. L'aspect de spongiose à neutrophiles souvent observé dans le pemphigus à IgA est parfois également observé dans le pemphigus à IgG.

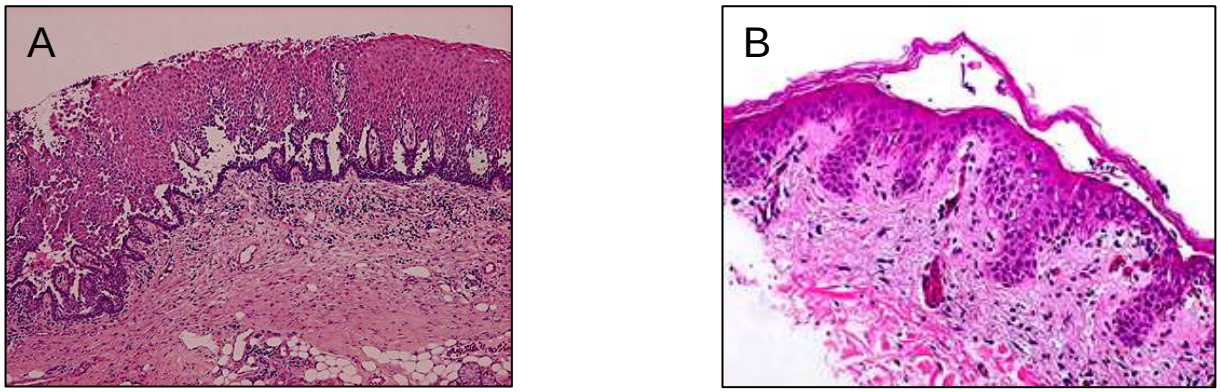


Figure 16. Histologie des pemphigus. L'examen en histologie d'une biopsie pratiquée au niveau d'une lésion bulleuse met en évidence un clivage intra-épidermique situé au-dessus de la couche basale chez les malades de PV (clivage profond) (A) et sous la couche cornée ou au niveau de la couche granuleuse chez les malades de pemphigus superficiel (clivage superficiel) (B).

B- Le pemphigus foliacé, l'archétype des pemphigus superficiels

Les pemphigus superficiels (PS) sont caractérisés par un clivage intra-épidermique survenant dans la couche granuleuse et par la quasi inexistence de lésions muqueuses. Il en existe différentes formes cliniques. L'archétype est constitué par le pemphigus foliacé (PF) dont la forme localisée constitue le pemphigus séborrhéique. Le pemphigus érythémateux y associe des signes de lupus érythémateux. Les pemphigus endémiques se rapprochent du PF mais présente des caractéristiques épidémiologiques très particulières constituant un modèle potentiellement informatif sur la ou les étiologies de la maladie.

Le PF, décrit par Cazenave en 1844, constitue la forme dite sporadique, par opposition à la forme endémique, du PS. Il s'agit d'une maladie très rare en France dont l'incidence est inférieure à 1 cas par million d'habitants et par an. Dans sa forme étendue, la maladie réalise un tableau d'érythrodermie désquamative associée à des bulles très superficielles et fugaces [Nousari, 2001] (Figure 17). Les lésions prédominent typiquement sur les zones séborrhéiques (région médiofaciale, cuir chevelu, région présternale et partie

supérieure du dos). Le signe de Nikolsky est positif. Des lésions pustuleuses peuvent dominer le tableau [Matsuo, 2001]. L'atteinte muqueuse est très inhabituelle et, lorsqu'elle est présente, se traduit par des érosions buccales très superficielles moins sévères que dans le PV.

Figure 17. Lésions de pemphigus superficiel.

Au stade initial de la maladie, l'histologie des lésions révèle un clivage intra-épidermique par acantholyse, situé sous la couche cornée ou dans la granuleuse. Un infiltrat dermique superficiel très discret composé de polynucléaires éosinophiles peut être observé. A la phase érythrodermique apparaît une parakératose associée à un œdème interkératinocytaire avec un infiltrat dermique et une exocytose de polynucléaires éosinophiles.

C- Le pemphigus paranéoplasique

Cette nouvelle variété de pemphigus a été décrite en 1990 par Anhalt [Anhalt, 1990] Bien qu'il ait été décrit dans de nombreux pays, le pemphigus paranéoplasique (PPN) est une maladie très rare. Le diagnostic est porté sur la coexistence de critères cliniques, histologiques et immunologiques ainsi que sur l'association à une néoplasie le plus souvent à type d'hémopathie lymphoïde (Figure 18) [Mutasim, 1993 ; Anhalt, 2004]. Cependant, aucun signe pris isolément n'est véritablement discriminant par rapport au PV. L'éruption cutanée se caractérise par son polymorphisme [Martel et Joly, 2001a] et associe grossièrement des signes de pemphigus, d'érythème polymorphe et de pemphigoïde bulleuse [Anhalt, 1997] ainsi que des lésions lichénoïdes [Camisa, 1993 ; Hsiao, 2001]. Bien que l'atteinte muqueuse soit prédominante, le PPN est la seule forme de pemphigus qui touche des tissus non recouverts par un épithélium stratifié

squameux. Approximativement 30 à 40% des cas vont développer une défaillance pulmonaire évoluant vers des changements caractéristiques d'un tableau de bronchiolite obstructive oblitérante, souvent létale [Nousari, 1999].

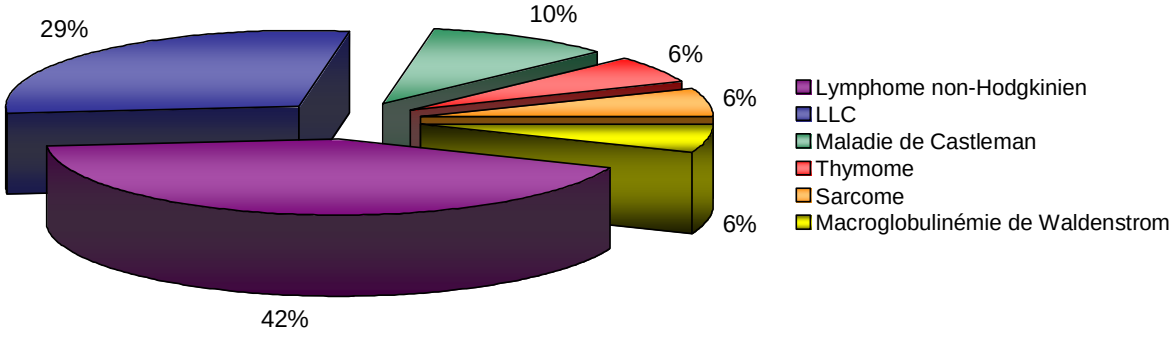


Figure 18. Tumeurs associées au pemphigus paranéoplasique.

Une acantholyse est présente comme dans les autres formes de pemphigus. Elle est le plus souvent suprabasale, mais est parfois située plus superficiellement au niveau du *stratum spinosum*. Des signes de souffrance kératinocytaire identiques à ceux observés au cours des érythèmes polymorphes graves sont habituellement associés : vacuolisation des kératinocytes basaux et nécroses kératinocytaires plus ou moins étendues. On retrouve également un infiltrat dermique superficiel composé de polynucléaires éosinophiles et de lymphocytes ayant parfois tendance à l'exocytose pouvant s'associer à un certain degré de spongiose. Si ces signes histologiques sont évocateurs, aucun n'est cependant spécifique du PPN [Joly, 2000]. L'étude en microscopie électronique d'un fragment de peau péribulleuse, de réalisation non systématique, met en évidence une acantholyse des kératinocytes basaux ainsi que des signes de souffrance, voire de nécrose kératinocytaire.

D- Les associations au pemphigus

1/ LES NEOPLASIES

Il convient de distinguer deux cadres bien distincts. D'une part, le PPN qui constitue une entité autonome présentant un profil clinique, histologique, immunologique et un pronostic distinct des autres pemphigus et qui est toujours associé à une néoplasie le plus souvent de lymphoïde (Figure 18). D'autre part, les autres types de pemphigus pouvant s'associer à des cancers qui semblent correspondre à des coïncidences. En effet, les tumeurs solides (le plus souvent du sein, du poumon et de la peau) sont le plus souvent associées à des PV, plus rarement à des PS [Ota, 2000] et exceptionnellement à des PPN [Joly, 2000]. Les thymomes sont observés à la fois chez les patients atteints de

pemphigus foliacé, érythémateux et vulgaire. Dans certains cas le pemphigus apparaît après thymectomie. Il est souvent associé à une myasthénie [Younus, 1990]. Cette association cancer et pemphigus en particulier, le PPN pose la question des mécanismes physiopathologiques reliant auto-immunité et tumeur [Anhalt, 2001a]. Une hypothèse propose une réactivité croisée entre les Ag tumoraux et les Ag kératinocytaires. Alternativement, une anomalie de régulation du cycle cellulaire (anomalie de l'apopotose par exemple) pourrait à la fois être à l'origine d'une prolifération tumorale et d'un défaut d'élimination de clones lymphocytaires autoréactifs. Enfin, on ne peut exclure qu'une partie des cancers associés au pemphigus soit en partie liée aux traitements immunosuppresseurs utilisés pour traiter le pemphigus.

2/ LES MALADIES AUTO-IMMUNES

Un certain nombre de MAI ont été décrites en association aux pemphigus qu'il s'agisse des PS ou du PV (Tableau 12). Des associations à d'autres maladies bulleuses auto-immunes ont été également rapportées, notamment avec la pemphigoïde bulleuse et la pemphigoïde cicatricielle [Sami, 2001b]. Enfin des syndromes associant de multiples maladies auto-immunes ont été décrits (pemphigus, LED, syndrome de Sjögren, anémie hémolytique auto-immune, anticorps antithyroïdiens). Ces associations semblent donc indiquer qu'une anomalie commune de la régulation du système immunitaire peut conduire à différentes MAI. L'association à la myasthénie est particulière puisqu'elle s'observe dans deux tiers des cas avec un thymome [Younus, 1990].

Tableau 12. Associations entre pemphigus et d'autres maladies auto-immunes

Maladies auto-immunes non spécifiques d'organe	**Maladies auto-immunes spécifiques d'organe**
Lupus érythémateux disséminé	Anémie hémolytique auto-immune
Polyarthrite rhumatoïde	Anti-facteur VIII
Sclérodermie	Maladie d'Addison
Syndrome de Gougerot-Sjögren	Myasthénie
	Sclérose en plaque
	Maladies thyroïdiennes auto-immunes

II. LES SPECIFICITES DES AUTOANTICORPS AU COURS DES PEMPHIGUS

A- Les anticorps déposés et circulants

La mise en évidence de dépôts d'Ig à la surface des kératinocytes chez les patients atteints de pemphigus revient à Beutner en 1965 [Beutner, 1965]. Elle repose sur l'examen en immunofluorescence directe (IFD) d'un fragment biopsique périlésionnel. Le marquage fluorescent obtenu a l'aspect d'une maille de filet ou d'une résille (encore appelée substance intercellulaire : SIC) et reflète la fixation des Ac à la membrane des kératinocytes (Figure 19*A*). Ces Ac sont essentiellement de classe IgG et de sous-classes IgG1 et IgG4 (retrouvées respectivement chez 100% et 80% des patients) et plus rarement de sous-classes IgG2 et IgG3 [Tremeau-Martinage, 1995]. Toutefois, des dépôts d'IgA (caractéristiques des pemphigus à IgA) et d'IgM peuvent être associés aux dépôts d'IgG présents à la surface kératinocytaire. Par ailleurs, des dépôts concomitants de fragment C3 du complément sont observés dans 50% des cas de PV.

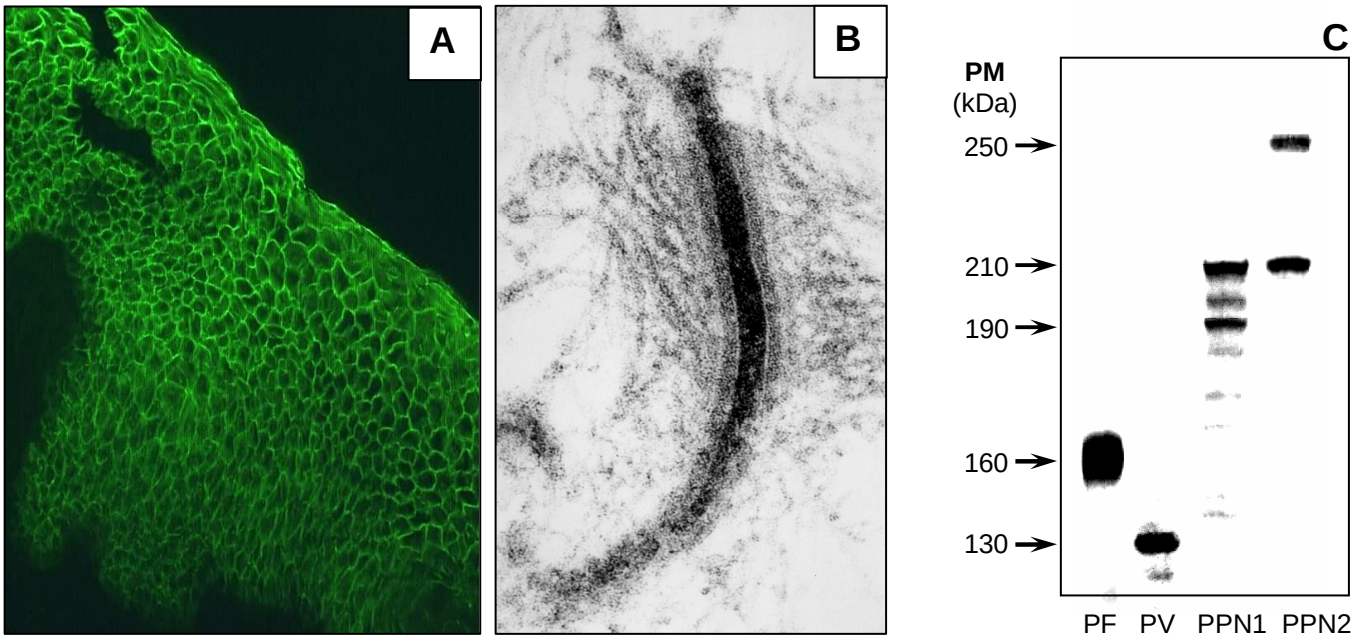


Figure 19. Les réactivités des autoanticorps chez les malades atteints de pemphigus. Les analyses en immunofluorescence directe (sur coupes de biopsie de peau périlésionnelle) ou indirecte (incubation du sérum avec des coupes de peau humaine saine) révèlent un marquage fluorescent de la substance intercellulaire de l'épiderme prenant l'aspect d'une résille (A). L'examen en immunomicroscopie électronique montre que les IgG déposées dans la peau des malades ou circulants dans leur sérum se fixent dans l'espace interkératinocytaire de l'épiderme ou desmoglie (B). L'analyse des sérums par immunoempreinte d'un extrait protéique d'épiderme humain permet de mettre en évidence des IgG dirigées contre ; la Dsg1 (160 kDa) chez malades de PF, la Dsg3 (130 kDa) chez les malades de PV et le plus fréquemment contre le doublet périplakine/envoplakine (190-210 kDa) et/ou le doublet desmoplakine II/I (210-250 kDa) (C) chez les malades de PPN. Des profils de réactivité identiques sont observés avec les expériences d'immunoprécipitation d'un extrait de kératinocytes avec les sérums de malades.

Les Ac circulants chez les malades atteints de pemphigus sont avant tout détectés par immunofluorescence indirecte (IFI). Les substrats les plus utilisés sont la peau humaine, l'œsophage de singe et la langue de rat. Les Ac donnent un aspect de fluorescence intercellulaire de l'épiderme identique à celui observé en IFD (Figure 19*A*). Ces Ac anti-SIC sont essentiellement d'isotype IgG, en particulier de sous-classe IgG1 et IgG4 et leur titre est généralement corrélé à l'activité de la maladie. Un marquage fluorescent de la membrane basale associé à une fluorescence intercellulaire est parfois observé avec les sérums de PPN mais a occasionnellement été décrit dans certaines formes de PS (pemphigus de Senear Usher). Par ailleurs, les sérums de PPN marquent en IFI des substrats habituellement non marqués par les sérums de pemphigus vulgaire ou superficiels : vessie de rat (qui est le substrat le plus sensible et le plus spécifique [Helou, 1995]), intestin grêle, foie (canalicules biliaires) ou myocarde de rat (stries scalariformes) [Joly, 2000]. Enfin, d'autres techniques permettent de mettre en évidence la présence d'autoAc dans le sérum des malades et, feront l'objet d'un développement ultérieur.

B- Localisation et identification des antigènes cibles

La localisation des autoAg reconnus par les autoAc produits chez les malades atteints de pemphigus a été précisée par des techniques d'immunofluorescence et d'immunomicroscopie électronique (Figure 19*B*). Les techniques d'immunoprécipitation et d'immunoempreinte ont permis de déterminer leur poids moléculaire (Figure 19*C*). Les techniques de biologie moléculaire notamment le criblage de banques d'expression d'ADNc de kératinocytes à l'aide de sérum de malades ont permis le clonage des gènes codant pour ces autoAg et leur identification (Tableau 13), ainsi que leur production sous forme recombinante. Ces protéines recombinantes ont permis d'établir la cartographie des épitopes reconnus par les lymphocytes T et B autoréactifs et sont actuellement utilisées dans les techniques de détection des autoAc par ELISA, plus rapides et plus sensibles. Ne serons détaillées dans cette partie que les 3 principales entités de pemphigus, PF, PV et PPN.

1/ LE PEMPHIGUS VULGAIRE

La localisation ultrastructurale des Ag reconnus par les autoAc au cours du PV a été étudiée par la visualisation des dépôts d'Ac *in vivo* en immunomicroscopie électronique directe avec marquage à la péroxydase ou à l'or. Si tous les auteurs retrouvent des Ac fixés au niveau de l'espace interkératinocytaire (Figure 19*B*), leur localisation ultrastructurale précise reste controversée. En effet, pour la plupart des auteurs, les dépôts d'Ac sont situés exclusivement au niveau de la portion intercellulaire des desmosomes (desmoglie) [Akiyama, 1991]. D'autres auteurs retrouvent des dépôts à

la fois au niveau des desmosomes et des zones interdesmosomales, laissant entendre que l'Ag du PV est exprimé au niveau des desmosomes mais aussi sur les régions non desmosomales de la membrane kératinocytaire [Bedane, 1996]. L'identification de l'Ag reconnu par les Ac responsables du PV s'est faite par immunoprécipitation d'extraits kératinocytaires par les sérums de patients. Ces sérums sont capables d'immunoprécipiter un complexe protéique de 210 kDa. Ce complexe est constitué d'une protéine de 130 kDa, la Dsg3 et d'une protéine de 85 kDa, la PG [Stanley, 1982]. C'est la Dsg3 qui est reconnue par les autoAc lorsque les sérums de patients sont testés en immunoempreinte sur extrait d'épiderme humain ou de tissu bovin [Stanley, 1984] (Figure 19*C*). La PG est coprécipitée avec la Dsg3 à laquelle elle est liée par des ponts disulfures. Elle n'est pas reconnue par les autoAc en immunoempreinte. Le gène codant pour la Dsg3 a été cloné par criblage de banques d'expression d'ADNc préparées à partir de kératinocytes avec des sérums de patients [Amagai, 1991 ; Silos, 1996].

2/ LE PEMPHIGUS FOLIACE

Il a été montré dès 1977 que les dépôts d'IgG siègent au niveau de l'espace interkératinocytaire. Les données les plus récentes ont confirmé la localisation strictement desmosomale de l'Ag du PF en montrant une colocalisation des Ac de PF avec ceux dirigés contre la PG et les DP [Rappersberger, 1992]. Les sérums de PS immunoprécipitent un complexe antigénique de 260 kDa constitué d'une protéine de 160 kDa, la Dsg1, et de la PG. En immunoempreinte, c'est la Dsg1 qui est reconnue par les sérums de patients atteints de pemphigus séborrhéique, de pemphigus érythémateux, de PF et de pemphigus endémique [Stanley, 1986a ; Stanley, 1986b] (Figure 19*C*). Comme pour la Dsg3, la PG reliée au domaine intracytoplasmique de la Dsg1 qu'elle ancre ainsi dans la plaque desmosomale, n'est pas reconnue par les autoAc. Le gène de la Dsg1 a été cloné et séquencé, ce qui a permis de rattacher la Dsg1 comme la Dsg3 à la famille des cadhérines desmosomales [Nilles, 1991 ; Wheeler, 1991 ; Frank, 2001 ; Hunt, 2001].

3/ LE PEMPHIGUS PARANEOPLASIQUE

L'étude en immunomicroscopie électronique des lésions cutanées de PPN révèle un marquage de la desmoglie, des plaques desmosomales et de la jonction dermo-épidermique au niveau des hémidesmosomes, traduisant comme nous le verrons plus bas, la reconnaissance d'Ag de la desmoglie mais aussi des plaques desmosomales et hémidesmosomales [Joly, 1994]. Les sérums de patients atteints de PPN immunoprécipitent un complexe antigénique composé de protéines de 250, 230, 210, 190 et 170 kDa [Anhalt, 1990 ; Anhalt, 1997] (Figure 19*C*). La quasi-totalité de ces bandes est maintenant identifiée. L'Ag de 250 kDa correspond à la DPI [Oursler, 1992], celui de 230

kDa à l'Ag majeur de la pemphigoïde bulleuse (BPAG1) ; la bande de 210 kDa est constituée d'un doublet correspondant à la DPII et à l'ENV [Kim, 1997] ; enfin l'Ag de 190 kDa a été cloné et correspond à la PPL [Aho, 1999 ; Borradori, 1998 ; Kiyokawa, 1998 ; Mahoney, 1998]. L'Ag de 170 kDa n'est toujours pas identifié. De plus, il a été montré que l'HD1-plectine, autre membre de la famille des plakines de poids moléculaire élevé (>500 kDa) et donc d'identification difficile en immunoempreinte, est également reconnue par certains sérums de PPN [Aho, 1999]. Récemment, il a été montré que les sérums de PPN contiennent non seulement des Ac anti-plakines mais aussi des Ac anti-Dsg dont le rôle physiopathologique semble de première importance et sera discuté ultérieurement. Enfin, un cas de PPN avec des Ac anti-PG a été rapporté [Ishii, 2001b].

Tableau 13. Autoantigènes des pemphigus

Pemphigus	**Autoantigènes (poids moléculaire)**
Pemphigus superficiels	Desmogléine 1 (160 kDa)
Pemphigus vulgaire	Desmogléine 3 (130 kDa) Desmogléine 1
Pemphigus herpétiforme	Desmogléine 3 (130 kDa) Desmogléine 1
Pemphigus à IgA	Desmocolline 1 (105-115 kDa) Desmogléine 3 Desmogléine 1
Pemphigus paranéoplasique	*Complexe paranéoplasique* : HD1-Plectine (500 kDa) Desmoplakine I (250 kDa) Antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse BPAG1 (230 kDa) Desmoplakine II (210 kDa) Envoplakine (210 kDa) Périplakine (190 kDa) Inconnu (170 kDa) Desmogléine 1 Desmogléine 3

C- Les anticorps anti-desmogléines

Les autoAc dirigés contre les Dsg et présents dans le sérum des malades, reconnaissent des épitopes conformationnels, calcium-dépendants, localisés principalement sur les domaines EC de ces protéines [Amagai, 1995b ; Emery, 1995 ; Kowalczyk, 1995]. Cependant, une étude récente de Hertl *et al* démontre que la majorité des sérums de PV reconnaissent aussi des épitopes non conformationnels localisés sur la région EC de la Dsg3 et que le titre de ces autoAc est corrélé à l'activité de la maladie [Muller, 2006]. De même, bien que la réactivité des Ac anti-Dsg soit apparemment indépendante de la glycosylation des épitopes, une étude a montré la possibilité d'inhiber la fixation et l'action pathogène des Ac anti-Dsg1 par l'utilisation d'agglutinine de plante (lectine) ou de certaines glycosidases [Ortiz-Urda, 2003].

L'étude de la cartographie épitopique de ces autoAc montre que la majorité des autoAc des malades (69,8% des sérums de PF et 77,5% des sérums de PV) reconnaissent l'extrémité N-terminale, notamment le domaine EC1 et une partie d'EC2 (position 1-161), précisément les épitopes formés des aminoacides 26-87 de la Dsg1 et 25-88 de la Dsg3 [Sekiguchi, 2001]. Cette réactivité pourrait résulter d'un mécanisme de diversification progressive de la réponse auto-immune désignée sous le terme d'extension épitopique intramoléculaire. Ainsi, a t-il été montré par l'équipe de Diaz que les Ac de patients atteints de pemphigus endémique brésilien (*fogo selvagem*), réagissent avec le domaine EC5 de la Dsg1 durant les phases d'inactivité et/ou de rémission de la maladie, et avec le domaine EC2 pendant la phase active [Li, 2003]. Un phénomène d'extension épitopique intramoléculaire de la réponse Ac anti-Dsg3 a également été décrit au cours du PV [Salato, 2005]. L'étude de la cartographie épitopique au cours du PPN montre que la réponse autoAc dirigée contre la région EC de la Dsg3 est plus diversifiée que celle observée au cours du PV [Futei, 2003]. Il faut ajouter que le domaine intracellulaire des Dsg peut être la cible des autoAc chez quelques patients [Ohata, 2001]. Il est désormais bien établi qu'au cours du pemphigus, la réponse autoAc est polyclonale [Futei, 2000 ; Sekiguchi, 2001]. L'étude du répertoire B autoréactif a débuté depuis peu, grâce à la production de scFv (*single-chain variable-region fragments*) dirigés contre les Dsg et générés par la méthode de *phage display* à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) isolées chez un patient présentant une forme cutanéomuqueuse de PV. La caractérisation des scFv ayant une spécificité unique (n=43) a confirmé le caractère polyclonal de la réponse autoAc comprenant à la fois des Ac pathogènes et non pathogènes. De plus, les analyses génétiques ont révélé (i) une corrélation entre l'utilisation préférentielle de certains segments VH et la spécificité antigénique (Dsg1, Dsg3 ou les 2) ; (ii) l'emploi prédominant de chaînes légères d'isotype λ ; (iii) l'existence d'hypermutations somatiques dirigées par la Dsg3 [Payne, 2005].

L'immunoempreinte a été longtemps utilisée pour détecter la présence d'Ac anti-Dsg. Sa sensibilité est limitée du fait de la dénaturation des Ag. Des tests ELISA utilisant les Dsg1 et Dsg3 recombinantes ont donc été développés. Ils ont une sensibilité et une spécificité de l'ordre de 95% [Ishii, 1997, Amagai, 1999a], et permettent de suivre l'évolution de la maladie [Cheng, 2002]. Les tests ELISA actuellement commercialisés (MBL, Medical & Biological Laboratories) constituent un outil rapide de détection et de dosage des Ac anti-Dsg. Les études de sous-classes menées en ELISA ont confirmé la quasi exclusivité des IgG4 et IgG1 anti-Dsg chez les malades. La tendance est que les IgG1 et les IgG4 réagissent respectivement avec des épitopes linéaires et des épitopes conformationnels des Dsg [Hacker, 2002]. Il semble que ce soit plutôt les IgG4 qui sont corrélées à l'activité de la maladie et donc qui interviennent dans les processus physiopathologiques [Warren, 2003]. Dans le PPN, les IgG1 et les IgG2 anti-Dsg3 apparaissent comme les sous-classes les mieux représentées [Futei, 2003]. Les analyses de réactivité autoAc des sérums de PPN ont en effet montré qu'ils contiennent des Ac anti-Dsg en plus des Ac anti-plakines. Ces données sont discutées dans le chapitre « chevauchement de la réponse anticorps ». De manière surprenante, des Ac anti-Dsg ont été détectés par ELISA dans d'autres pathologies cutanées que les pemphigus : (i) des anti-Dsg3 chez les souris lupiques notamment les souris MRL *lpr/lpr* [Nishimura, 2005] ; (ii) des anti-Dsg1 et anti-Dsg3 à faible titre chez les patients atteint de lichen plan oral [Lukac, 2006] ; (iii) des anti-Dsg1 chez les malades présentant un syndrome d'épidermolyse staphylococcique ou *staphylococcal scalded skin syndrome* [Anzai, 2006]. Aucune donnée ne permet d'affirmer que la production de ces autoAc intervient dans les processus physiopathologiques de ces maladies. Elle semble plutôt être la résultante d'un épiphénomène comme par exemple une réactivité croisée dûe à un mimétisme moléculaire. A cette égard, une étude récente montre que les IgA anti-transglutaminase présents chez certains malades atteints de maladie coeliaque peuvent réagir de façon croisée avec la Dsg1, la protéine VP7 du rotavirus, la protéine de choc thermique Hsp60 et le récepteur TLR4 [Zanoni, 2006].

Enfin, les sérums de pemphigus contenant des Ac anti-Dsg1 réagissent avec la Dsg4 dans 77% des cas. L'exploration de cette réactivité a montré qu'il s'agit en réalité d'une réactivité croisée des Ac anti-Dsg1 avec la Dsg4 et que les autoAc spécifiques de la Dsg4 ne possèdent à priori aucun pouvoir pathogène [Nagasaka, 2004].

D- Les anticorps anti-plakines

La PPL et l'ENV sont les autoAg les plus fréquemment reconnus au cours du PPN [Hashimoto, 1995] et *ipso facto*, en font les cibles antigèniques les plus spécifiques de la maladie [Joly, 2000]. Les épitopes exprimés par ces deux protéines sont situés sur les

différents domaines à l'exception du domaine C-terminal de la périplakine [Nagata, 2001]. Une étude plus précise de la cartographie épitopique montre que 92% des sérums de PPN ayant une réactivité anti-190-210 kDa (n=12) reconnaissent le sous-domaine de liaison (*linker*) de l'ENV et de la PPL. Plus précisément, le peptide LLDRKSGKQYSIEAALRCRR contenu dans la région *linker* de l'envoplakine représente un épitope immunodominant, reconnu chez 75% des malades. Enfin, il a été montré que les cellules B CD20+ exprimées par les tumeurs de Castleman de malades atteints de PPN ont la capacité de fixer avec une forte affinité ce peptide immunodominant [Zhang, 2006]. Wang *et al* ont montré que la résection des tumeurs de Castleman présentes chez des malades de PPN aboutit à une disparition des lésions cutanéomuqueuses et des autoAc circulants [Wang, 2004a]. L'analyse immunohistologique des tumeurs a révélé une architecture lymphoïde comprenant des cellules T regroupées au sein de zones interfolliculaires et des cellules B prédominantes dans des follicules lymphoïdes. Les auteurs ont montré que les IgG produites par les tumeurs en culture donnent un marquage fluorescent de l'épithélium transitionnel de la vessie de souris en IFI et reconnaissent un doublet protéique de 190-210 kDa en immunoempreinte sur un extrait d'épiderme humain. Par ailleurs, les cellules B isolées des tumeurs chez les 7 malades expriment et partagent 2 profils de réarrangement génique de la CDR3 de la chaîne H des IgG [Wang, 2004a]. Ces résultats suggèrent que des clones B tumoraux produisent des autoAc dirigés contre les protéines desmosomales notamment, l'ENV et la PER et que ce processus est dirigé par l'Ag. Ces travaux insistent donc sur le rôle de la tumeur dans l'étiologie auto-immune du PPN. Au cours du PPN, les autoAc les plus fréquemment détectés, après ceux dirigés contre le doublet ENV-PPL ciblent les DPI et II, la protéine BPAG1 et la PL [Anhalt, 2004]. Actuellement, très peu d'études ont été réalisées dans le but de caractériser la réponse anti-plakine dans le PPN. La pathogénicité des Ac anti-plakines reste à démontrer.

La présence d'autoAc anti-plakines a été décrite dans d'autres variétés de pemphigus : des Ac dirigés contre la PER et l'ENV dans les PV et PF [Kazerounian, 2000 ; Nagata ; 2001], des Ac anti-PER, anti-ENV et anti-DPI dans le pemphigus colombien [Abreu-Velez, 2003a] et des Ac anti-BPAG1 chez quelques PF [Karlhofer, 2003]. Par ailleurs, plusieurs travaux ont dévoilés l'existence d'une production d'Ac anti-DPI et anti-DPII dans un sous-groupe de malades atteints d'érythème multiforme caractérisé par des lésions muqueuses [Foedinger, 1995]. Ces autoAc sont dirigés contre un peptide de l'extrémité C-terminale des DP et plusieurs arguments plaident en faveur de leur rôle pathogène [Foedinger, 1998].

E- Le chevauchement de la réponse autoanticorps au cours des pemphigus : Conséquence d'un phénomène d'extension épitopique ?

L'association d'un Ag cible à un type de pemphigus (PV et Dsg3, PF et Dsg1, PPN et plakines) ne doit pas être considéré au sens strict : en effet, les Dsg 1 et Dsg3 sont en fait la cible de la réponse auto-immune dans plusieurs types de pemphigus. Entre la moitié et les deux tiers des patients atteints de PV ont dans leur sérum des Ac anti-Dsg1 en plus des Ac anti-Dsg3. D'autre part, certains patients atteints de PV peuvent rechuter avec des manifestations de PS et réciproquement [Ishii, 2000 ; Komai, 2001]. Plusieurs études en ELISA ont montré que les patients ayant une atteinte muqueuse prédominante n'ont que des Ac anti-Dsg3 alors que les patients ayant à la fois une atteinte muqueuse et une atteinte cutanée ont à la fois des Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 [Harman, 2001]. Il a été montré dans le modèle de transfert passif d'autoAc au souriceau BALB/c, que les Ac anti-Dsg1 présents dans les sérums de PV étaient pathogènes et nécessaires, en association avec les Ac anti-Dsg3, pour produire un clivage épidermique suprabasal. Le profil sérologique des patients peut être corrélé au type clinique de pemphigus : les sérums ne contenant que des Ac anti-Dsg1 correspondent à des PS, les sérums ne contenant que des Ac anti-Dsg3 correspondent à des formes muqueuses prédominantes de PV et les sérums contenant les deux types d'Ac correspondent à des formes cutanéomuqueuses de PV (Figure 20) [Amagai, 1999b ; Mahoney, 1999a]. Ainsi, la topographie dans l'épiderme des lésions cutanées est-elle en accord avec la distribution relative de la Dsg1, fortement exprimée au niveau des couches superficielles de la peau et celle de la Dsg3 fortement exprimée au niveau des couches basales de l'épiderme. L'apparition d'Ac anti-Dsg1 parallèlement aux lésions cutanées au cours du PV pourrait constituer une illustration du phénomène d'extension épitopique intermoléculaire, d'une réponse strictement dirigée contre la Dsg3 vers une réponse dirigée à la fois contre la Dsg1 et le Dsg3. De manière intéressante, la transition du phénotype muqueux vers le phénotype cutanéomuqueux semble être précédée d'une extension de la réponse anti-Dsg3 de la région C-terminale du domaine EC vers le domaine EC1 de la protéine [Salato, 2005]. Cependant, il a été rapporté quelques cas de PV avec atteinte cutanéomuqueuse chez lesquels les Ac anti-Dsg1 étaient détectables précocement au cours de la maladie, avant l'apparition des lésions cutanées [Harman, 2000]. L'hypothèse alternative à l'extension épitopique, serait une prédétermination du profil sérologique par le terrain génétique. Des études complémentaires, s'intéressant aux profils clinique et sérologique des patients atteints de PV en fonction de marqueurs génétiques et en particulier des gènes HLA de classe II, sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, des Ac anti-Dsg1 sont fréquemment mis en évidence au cours du pemphigus herpétiforme, et

exceptionnellement des Ac anti-Dsg3, faisant de cette variété de pemphigus une variante de PS ou plus rarement, de pemphigus profond.

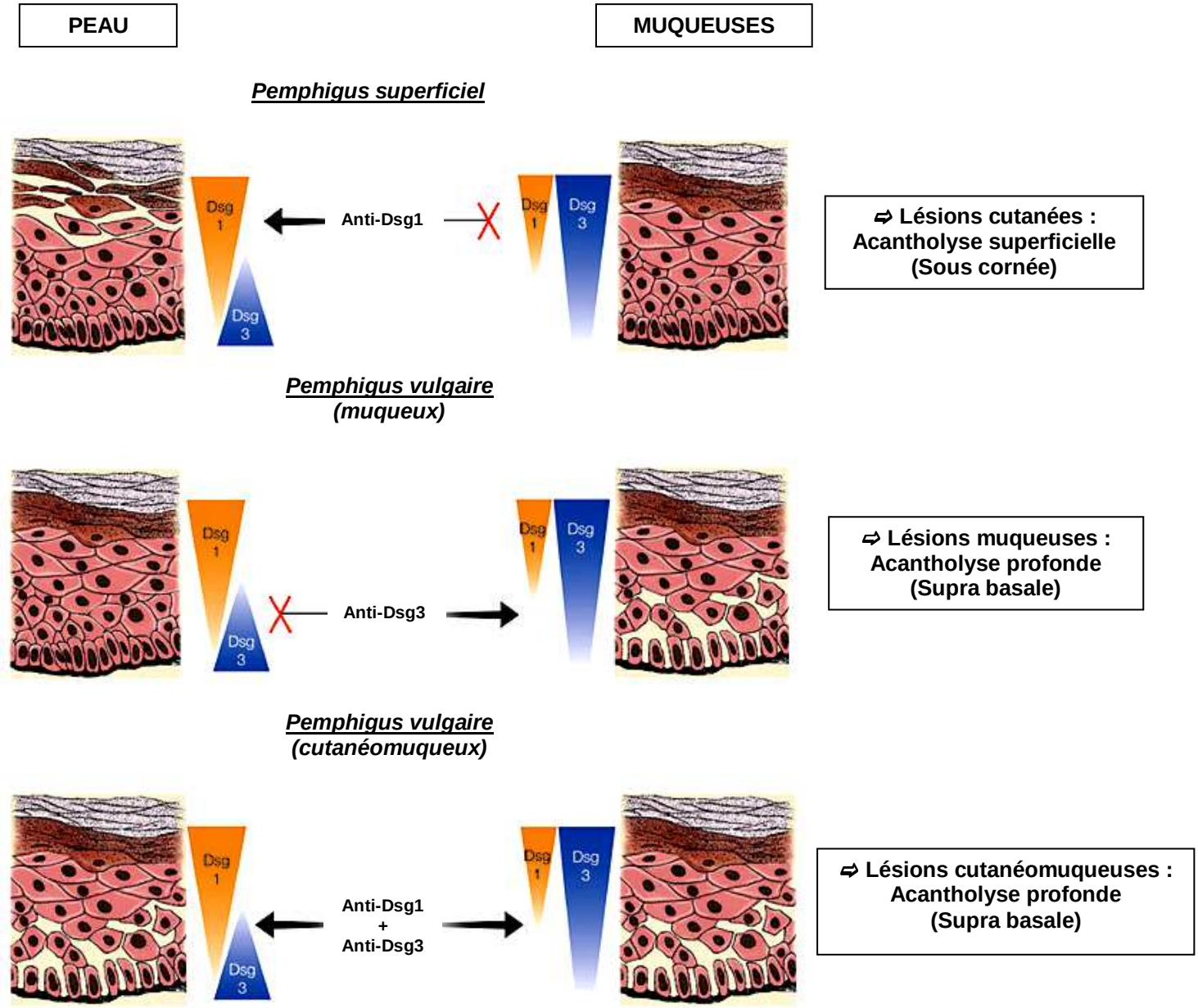


Figure 20. Corrélation entre les populations d'anticorps anti-desmogléines et les phénotypes clinico-histologiques de pemphigus. Les sérums de PS contiennent des Ac anti-Dsg1 qui interfèrent avec la fonction d'adhésion des Dsg1 et induisent une acantholyse superficielle puisque la Dsg3 coexprimée dans les couches basales de l'épiderme compense dans cette zone, la perte d'adhésion médiée par les Ac anti-Dsg1. Au cours du PV de type muqueux, seuls des Ac anti-Dsg3 sont produits et provoquent une acantholyse profondes dans les muqueuses. A eux seuls, ils ne sont pas suffisants pour provoquée des lésions cutanées de par l'expression de la Dsg1 qui compense dans l'épiderme, la détérioration de l'adhésion dépendante de la Dsg3. Le développement du phénotype cutanéomuqueux de PV requiert la présence des 2 populations d'autoAc (anti-Dsg1 et anti-Dsg3).

Le PPN constitue une seconde illustration du chevauchement de la réponse Ac au cours des pemphigus [Joly, 1994]. En effet, la mise en évidence en immunoempreinte d'Ac anti-Dsg3 et anti-Dsg1 dans des sérums de patients atteints de PPN [Joly, 1994 ; Hashimoto, 1998 ; Martel, 2000], a été confirmée grâce à l'utilisation des tests ELISA anti-Dsg1 et anti-Dsg3 : 100% des sérums de PPN contiennent des Ac anti-Dsg3 et 65% des Ac anti-Dsg1 [Amagai, 1998]. Les Ac anti-Dsg3 sont pathogènes, et leur immunoadsorption supprime le pouvoir pathogène des sérums de PPN lors d'expériences de transfert passif au souriceau BALB/c. Cette observation pourrait rendre compte des similitudes tant cliniques (atteinte muqueuse prédominante) qu'histologiques (clivage suprabasal) du PPN et du PV. Cependant, la relation entre le phénotype clinique (atteinte muqueuse prédominante ou atteinte cutanéomuqueuse) et le sérotype (Ac anti-Dsg3 seuls ou associés à des Ac anti-Dsg1) n'est pas retrouvée au cours du PPN [Ohyama, 2001]. De plus quelques cas de PPN pourraient ne pas présenter d'Ac anti-Dsg [Inaoki, 2001]. Enfin, l'antigène F12 (de poids moléculaire 185 kDa) décrit initialement pour être reconnu au niveau des plaques desmosomales et des hémidesmosomes par les sérums de PPN, l'est également par 1/3 des sérums de PV et de PF [Joly, 1997]. La diversité de la réponse Ac au cours du PPN et la capacité des sérums à reconnaître des Ag intracellulaires (plakines) pourrait également constituer une illustration du phénomène d'extension épitopique [Marzano, 2001 ; Chan, 2000 ; Bowen, 2000].

F- Les anticorps anti-récepteurs à l'acétylcholine

Le dogme établi stipulant que seules des IgG anti-Dsg1/Dsg3 ont la capacité d'induire un pemphigus chez la souris par transfert passif, a été remis en cause par les travaux de l'équipe de Grando. Celui-ci réfute les résultats des expériences d'immunoadsorption des sérums sur les Dsg recombinantes dans la mesure où elles sont exprimées sous forme de protéines de fusion avec le domaine constant des IgG et pourraient ainsi fixer des Ac ayant une autre spécificité. C'est en partant de cette idée que Nguyen *et al* ont montré que les IgG de PV immunopurifiées sur les Dsg1 et Dsg3 recombinantes reconnaissent en immunoempreinte des bandes de différents poids moléculaires ne correspondant à aucune des 2 protéines [Nguyen, 2000a]. De plus, cet auteur a montré que les IgG d'un sérum de PV (ne contenant pas d'Ac anti-Dsg1) immunopurifiées sur la Dsg3 recombinante sont capables d'induire une acantholyse chez le souriceau Dsg3-/- et chez la souris *bal* (invalidée pour la Dsg3) et produisent en IFD un marquage de type intercellulaire [Nguyen, 2000a ; Vu, 1998]. Par immunocriblage de banque d'expression dADNc, cette équipe a identifié un nouvel autoAg reconnu par les Ac élués d'une bande à 75kDa reconnue par un sérum de PV [Nguyen, 2000c]. Ces Ac produisent en IFI un aspect de marquage de la SIC et sont capables d'induire une

acantholyse sur des kératinocytes en culture monocouche. Ils reconnaissent une nouvelle protéine, nommée pemphaxine (ou annexine 31), capable de lier l'ACh. La préadsorption de sérums de PV en présence de pemphaxine recombinante inhibe leur pouvoir acantholytique par transfert passif. Cependant, les Ac anti-pemphaxine, immunopurifiés sur l'Ag recombinant, ne sont pas pathogènes à eux seuls. Ajoutés aux sérums préadsorbés, ils restaurent leur pouvoir pathogène. Le rôle d'un autre récepteur de l'ACh, l'α9 AChR a également été évoqué sur l'observation que des IgG de PV bloquent la capacité d'un Acm anti-α9 AchR de donner en IFI sur œsophage de singe un marquage de la SIC [Nguyen, 2000b]. En immunoempreinte utilisant comme substrat un extrait d'épiderme, cet Ac reconnaît une bande de 50 kDa. Il est capable d'induire une acantholyse sur des kératinocytes en culture monocouche.

La présence d'Ac dirigés contre des récepteurs à l'ACh au cours du pemphigus est donc possible même si les données disponibles jusqu'à présent ne permettent pas d'estimer leur prévalence ni d'affirmer leur rôle dans la physiopathologie de la maladie (qui sera abordé plus bas). Les Dsg restent donc, jusqu'à preuve du contraire, les Ag majeurs des pemphigus.

III. LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PEMPHIGUS

A- La pathogénicité des autoanticorps

La pathogénicité des autoAc a été clairement montrée dans le PV, le PS [Anhalt, 1982 ; Roscoe, 1985] et le PPN [Amagai, 1998]. D'abord suspecté sur des éléments d'observation clinique tels que l'évolution parallèle du taux d'Ac et de l'activité de la maladie, l'efficacité des plasmaphérèses et les cas de pemphigus néonatal transitoire induits par transfert transplacentaire des autoAc, le rôle pathogène des Ac a ensuite été montré dans des modèles d'acantholyse *in vitro* et *in vivo*. Récemment, un modèle expérimental murin de PV a permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie.

1/ PREUVES INDIRECTES

Relation entre l'activité de la maladie et le taux d'anticorps circulants

Plusieurs études ont permis de montrer une corrélation entre le titre des Ac anti-SIC et l'activité de la maladie [Fitzpatrick, 1980]. Cette corrélation semble plus forte pour les pemphigus graves avec un taux élevé d'Ac et est retrouvée aussi bien au cours du PV qu'au cours des PS. Après rémission, le risque de récidive est plus élevé chez les patients chez lesquels persistent des Ac circulants détectables en IFI. La présence d'Ac fixés *in vivo* constituerait également un facteur prédictif de rechute. La surveillance du titre des Ac anti-SIC en IFI reflétant l'activité de la maladie, constitue donc un élément de surveillance

essentiel chez les patients traités ou en rémission [David, 1989]. L'avènement des techniques ELISA pour la détection et le titrage des Ac anti-Dsg et le diagnostic des pemphigus a permis par ailleurs de démontrer une corrélation positive entre le titre des Ac circulants dirigés contre les Dsg1/Dsg3 et l'activité de la maladie [Ishii, 1997 ; Amagai, 1999a ; Cheng, 2002]. Cependant, certaines observations telles que l'association d'une forme sévère de la maladie à un faible titre d'Ac anti-Dsg et inversement, suggèrent que le score établi par les tests ELISA ne reflètent pas de manière absolue l'activité de la maladie [Harman, 2001], probablement parce qu'ils détectent la présence d'autoAc sans activité pathogène. A cet égard, l'élaboration par Ishii *et al* d'un test quantitatif de mesure de l'activité pathogène des Ac anti-Dsg3 montre qu'un même titre d'autoAc peut s'observer durant les phases active ou de rémission tandis que la valeur du score de dissociation des kératinocytes est corrélée avec l'activité de la maladie [Ishii, 2005]. Ces résultats montrent que la réponse Ac dirigée contre les Dsg en plus d'être polyclonale, est hétérogène en terme de pouvoir pathogène.

Pemphigus néonatal

Chez les femmes atteintes de PV, il existe un risque de pemphigus néonatal par passage transplacentaire des IgG maternelles. Dans ce cas, le nouveau-né présente des lésions cliniques et histologiques de la maladie ainsi qu'une analyse en IFD positive [Chowdhury, 1998]. La plupart des nouveau-nés présentent des Ac circulants qui disparaissent en 2 semaines à 2 mois parallèlement aux signes cliniques et aux Ac maternels. Ces observations plaident fortement en faveur du rôle pathogène des autoAc d'origine maternelle chez le nouveau-né [Hup, 1986]. Au cours des PS et en particulier au cours du pemphigus endémique, aucun cas de pemphigus néonatal n'a été rapporté. Cependant certains nouveau-nés présentent des dépôts interkératinocytaires d'IgG ainsi que des Ac circulants détectés en IFI [Avalos-Diaz, 2000]. L'absence de lésions cliniques est expliquée par l'expression de Dsg3 dans les couches superficielles de l'épiderme chez l'embryon. En effet, contrairement à l'adulte, la Dsg3 serait coexprimée chez le nouveau-né avec la Dsg1 dans les couches superficielles où elle compenserait le défaut d'adhésion induit par les autoAc ne rendant possible la survenue d'un pemphigus néonatal que par la transmission transplacentaire d'Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 [Wu, 2000]. Cette théorie de la « compensation des Dsg » rendrait compte de l'absence de PS néonataux à l'inverse du PV néonatal.

2/ MODELES EXPERIMENTAUX

Modèles d'acantholyse *in vitro* (Figure 21*A*)

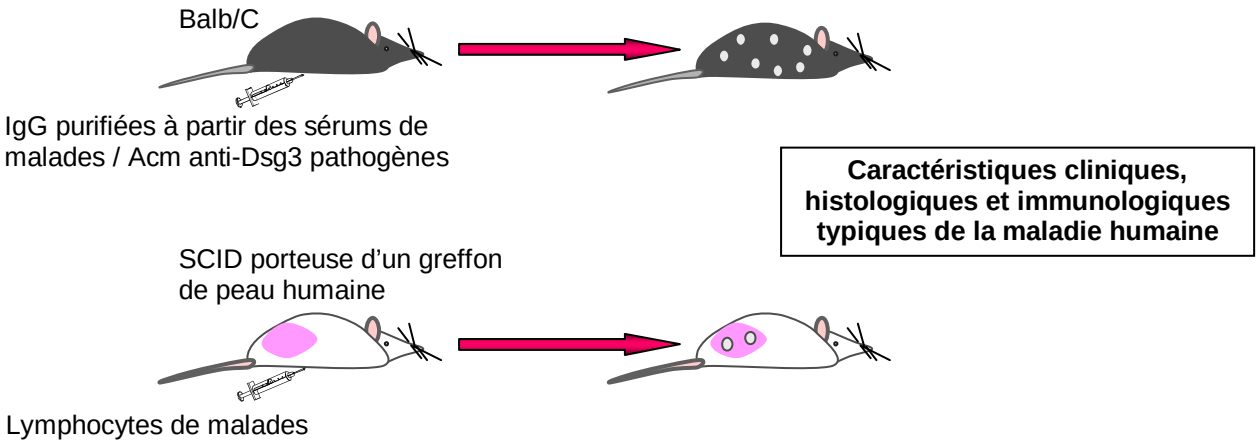
Ces modèles permettent d'étudier le pouvoir pathogène des Ac sur des kératinocytes ayant une différentiation aussi proche que possible de celle des kératinocytes *in vivo*. Les modèles utilisés sont des cultures de peau humaine totale, des cultures organotypiques ou des cultures de kératinocytes, modèle moins physiologique mais permettant de quantifier l'acantholyse. Le rôle pathogène des IgA dans le pemphigus à IgA a été montré à l'aide de cette technique. Ces modèles ont également permis l'étude ultrastructurale des modifications cellulaires induites par la fixation des Ac à la surface des kératinocytes : les IgG sériques de pemphigus sont internalisées dans les cellules acantholytiques au sein de vésicules d'endocytose qui fusionnent avec les lysosomes. Il se produit ensuite une réorganisation du cytosquelette au niveau des filaments intermédiaires de kératine et des microtubules [Kitajima, 1986]. Enfin, très récemment la mise au point d'un test quantitatif basé sur la mesure de la dissociation des kératinocytes cultivés en monocouche en présence de sérum humain permet d'évaluer très précisément l'activité pathogène des Ac anti-Dsg3 [Ishii, 2005].

Modèles d'acantholyse *in vivo* (Figure 21*B*)

Un modèle animal mis au point par Anhalt *et al* en 1982 [Anhalt, 1982], a permis d'apporter la preuve définitive de la pathogénicité des Ac au cours du pemphigus. L'injection intrapéritonéale à des souriceaux nouveau-nés BALB/c d'IgG purifiées à partir de sérums de PV, de PS ou de PPN, entraîne, en 18 à 72 heures, des lésions cutanées semblables à celles observées dans la maladie humaine. L'image histologique et l'analyse en IFD de ces lésions sont superposables à celles du pemphigus humain, de même que les modifications ultrastructurales observées en microscopie électronique. L'acantholyse obtenue est dose-dépendante et spécifique. Dans ce modèle, les Ac pathogènes du pemphigus endémique sont les IgG4. Ce modèle a également permis de montrer le rôle pathogène des Ac anti-Dsg3 au cours du PPN. Un autre modèle expérimental de pemphigus consiste à greffer de la peau humaine à des souris immunodéficientes (SCID) reconstituées avec des lymphocytes sanguins de patients atteints de pemphigus [Juhasz, 1993]. Par ailleurs, un Ac polyclonal pathogène a été dérivé par immunisation d'une souris BALB/c avec de la Dsg3 recombinante [Fan, 1999]. Enfin plus récemment, la pathogénicité d'un Acm anti-Dsg3 généré à partir des cellules B isolées d'un malade de PV a été établie par son transfert à des souriceaux BALB/c [Yeh, 2006].

A. *In vitro*

B. *In vivo* : Transfert passif



C. *In vivo* : Modèle murin de pemphigus vulgaire

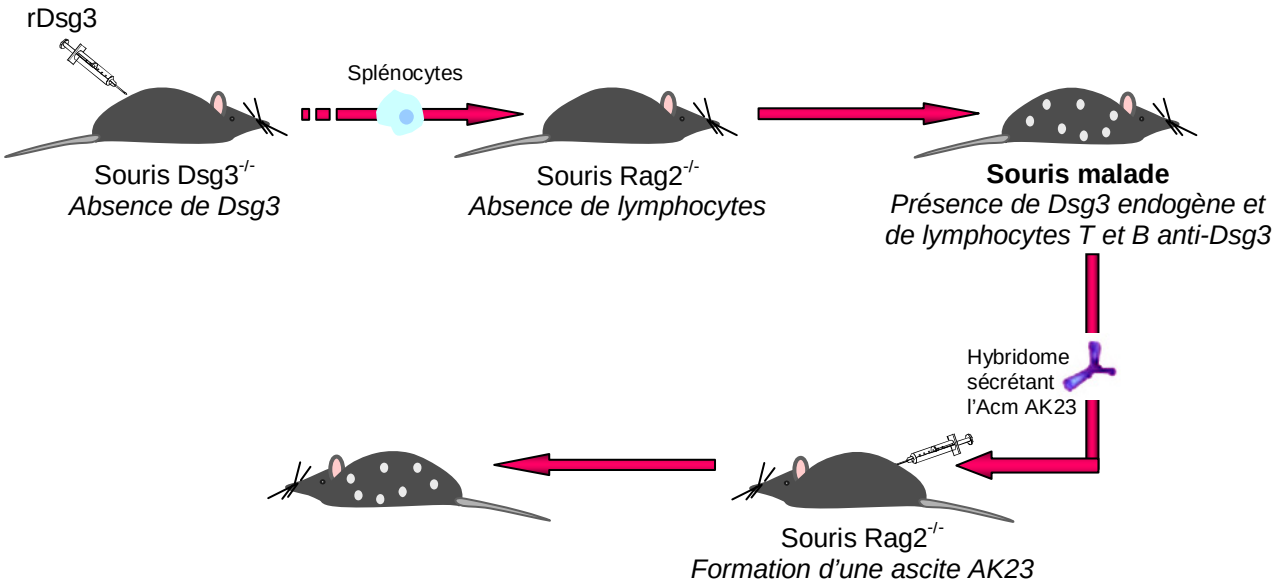


Figure 21. Modèles de pathogénicité des anticorps anti-desmogléines.

Modèle murin de pemphigus vulgaire (Figure 21*C*)

Un élégant modèle murin de PV a été développé par Amagaï et *al* qui ont transféré les splénocytes de souris déficientes pour la Dsg3 ou Dsg3 *Knock out* (Dsg3$^{-/-}$) [Koch, 1997] immunisées avec la Dsg3 recombinante de souris, à des souris receveuses Rag-2$^{-/-}$ (dépourvues de lymphocytes T et B). Les souris receveuses développent des lésions dont les aspects cliniques, histologiques et immunopathologiques sont similaires à ceux des patients atteints de PV [Amagaï, 2000, Ohyama, 2002]. Plus précisément, l'analyse du modèle montre : (i) la production d'IgG anti-Dsg3 dans le sérum des souris receveuses, 4 jours après le transfert des cellules spléniques dont le titre augmente rapidement pour atteindre un plateau au 21e jour ; les IgG anti-Dsg3 circulantes persistent jusqu'à 6 mois ; (ii) des dépôts d'IgG à la surface des kératinocytes dans la peau et les muqueuses orales et oesophagiennes ; (iii) une perte d'adhésion intercellulaire épithéliale aboutissant à une acantholyse suprabasale dans la muqueuse orale et l'œsophage ; (iv) une spongiose à éosinophiles ; (iv) une perte de poids (les lésions orales perturbant l'alimentation) et le développement d'érosions cutanées croûteuses ainsi que des plaques d'alopécie. En revanche, aucun changement phénotypique ou pathologique n'est observé chez les souris Rag-2$^{-/-}$ recevant des splénocytes de souris Dsg3$^{+/-}$. Afin de déterminer si la production des autoAc pathogènes est initiée par une rupture de la tolérance au niveau des cellules T ou des cellules B, les auteurs ont transféré à des souris Rag-2$^{-/-}$, différentes combinaisons de cellules T et B purifiées à partir des souris Dsg3$^{-/-}$, Dsg3$^{+/-}$ ou de souris normales. Seules les souris ayant reçu les cellules T et B isolées des souris Dsg3$^{-/-}$ produisent des Ac anti-Dsg3 à l'origine de la maladie [Tsunoda, 2002]. Ces constatations suggèrent que chez les souris et très probablement chez l'homme, la tolérance vis à vis de la Dsg3 est à la fois établie dans les populations lymphocytaires T et B, et qu'une rupture de la tolérance au niveau des cellules T et B est nécessaire à la production d'IgG anti-Dsg3 pathogènes et à l'expression de la maladie. Plus récemment, une étude montre que les lymphocytes B et T naïfs isolés de souris déficientes pour la Dsg3 mais non immunisées avec l'autoAg recombinant sont capables d'induire la production d'Ac anti-Dsg3 pathogènes et le développement de la maladie quand elles sont transférées chez les souris Rag-2$^{-/-}$ receveuses [Aoki-Ota, 2004]. Ces résultats démontrent que les lymphocytes T autoréactifs naïfs peuvent s'activer en réponse à la présentation de la Dsg3 par les cellules dendritiques et/ou les cellules de Langerhans des souris receveuses. Ce modèle est informatif et permet d'analyser les mécanismes de rupture de la tolérance périphérique vis à vis de la Dsg3. A cet égard, afin d'étudier les mécanismes de tolérance et de rupture de tolérance, Ota *et al* ont généré une souris exprimant une IgM de surface transgénique spécifique de la Dgs3 issue d'un Acm anti-Dsg3 non pathogène. Bien que les cellules B autoréactives fonctionnellement compétentes soient présentes dans la rate

et les ganglions lymphatiques et que les IgM anti-Dsg3 soient sécrétées dans le sérum des souris, celles-ci ne développent aucune des manifestations de la maladie humaine [Ota, 2004]. Ces données indiquent que les cellules B autoréactives vis à vis de la Dsg3 sont capables de se développer en présence de l'autoAg cible mais qu'elles restent indifférentes vis à vis de cet autoAg. En outre, le développement de la maladie chez les souris Rag-2$^{-/-}$ transférées avec des splénocytes peut être abrogé par l'injection préalable d'un Acm anti-CD154. Le blocage de l'interaction CD40/CD154 induit une tolérance vis à vis de la Dsg3 chez ces souris du fait de l'inhibition de la production d'autoAc anti-Dsg3 qui peut persister durant 70 jours malgré l'immunisation avec la Dsg3. Cette tolérance est transférable puisque le cotransfert des splénocytes de souris traitées avec l'Acm anti-CD154 et des splénocytes de souris Dsg3$^{-/-}$ suppriment la production d'Ac anti-Dsg3 chez les souris receveuses [Aoki-Ota, 2006]. Ces résultats suggèrent que l'interaction CD40/CD154 est indispensable à la production d'autoAc anti-Dsg3 et que des cellules régulatrices spécifiques de l'Ag sont générées par la suppression de cette interaction, ce qui pourrait représenter un intérêt thérapeutique.

Par ailleurs, le groupe de Amagaï a montré que la maladie peut être induite par transfert passif chez les souris adultes normales, d'un Acm anti-Dsg3 (AK23) dérivé des souris Rag2$^{-/-}$ receveuses des splénocytes des souris Dsg3$^{-/-}$ immunisées (Figure 21*C*). Cet Acm de sous-classe IgG1 est dirigé contre un épitope conformationnel, calcium-dépendant de l'extrémité N-terminale de la Dsg3 (aminoacides 1 à 63). Il reconnaît spécifiquement 4 résidus aminoacides (V3, K7, P8 et D59), supposés former l'interface d'adhésion des Dsg entre-elles [Tsunoda, 2003]. Très récemment, 10 Acm anti-Dsg3 différents ont été dérivés des souris receveuses et leur spécificité vis-à-vis des épitopes cibles et leur pouvoir pathogène sur des cultures de kératinocytes caractérisés. Les expériences de pathogénicité réalisées par le transfert des hybridomes à des souris adultes Rag2$^{-/-}$ ont montré que chaque Acm pris individuellement n'a pas la capacité de reproduire la maladie chez l'animal. Cependant, l'injection de différentes combinaisons d'hybridomes sécrétant des IgG hétérogènes en terme de pouvoir pathogène et de spécificité épitopique induit le développement du phénotype de PV chez les souris receveuses [Kawasaki, 2006]. Ainsi, la pathogénicité de la réponse autoAc est-elle la conséquence d'un effet synergique des différents Ac anti-Dsg3 et pourrait refléter la réponse polyclonale observée chez l'homme.

B- Les mécanismes physiopathologiques

Le desmosome constitue le principal système de jonction interkératinocytaire. Les cadhérines desmosomales jouent un rôle important dans l'adhésion interkératinocytaire en reliant les deux demi-desmosomes. Ce rôle a été montré récemment grâce à un modèle

de souris invalidée pour le gène de la Dsg3 (Dsg3^{null} ou Dsg3$^{-/-}$) [Koch, 1997]. En effet ces animaux qui n'expriment pas la Dsg3, présentent un retard de croissance lié à des lésions oropharyngées semblables à celle observées au cours du pemphigus et gênant l'alimentation. La présence d'une acantholyse suprabasale et d'une disjonction des desmosomes a été montrée par l'examen de biopsies muqueuses en histologie standard et microscopie électronique. La survenue de lésions proches de celles du PV chez la souris *bal* (présentant une mutation du gène de la Dsg3 responsable d'un codon stop), constitue une autre preuve du rôle de cette protéine desmosomale dans l'adhésion interkératinocytaire [Montagutelli, 1997]. Les mécanismes par lesquels les autoAc perturbent la fonction d'adhésion des Dsg restent controversés. Certaines théories font intervenir un blocage direct de la fonction adhésive des Dsg par les Ac. D"autres suggèrent que l'acantholyse résulterait de la transduction de signaux cellulaires initiée par la fixation des autoAc.

1/ INHIBITION DE LA FONCTION D'ADHESION DES DESMOGLEINES

De nombreux arguments sont en faveur d'une altération spécifique des fonctions adhésives de la Dsg1 et de la Dsg3 par les Ac correspondants. En effet, une stricte corrélation entre la spécificité des Ac transférés au souriceau nouveau-né (Ac anti-Dsg3 et/ou anti-Dsg1) et le phénotype clinique et histologique de la maladie développée par l'animal a pu être montrée [Mahoney, 1999a] (Figure 20). Chez les patients atteints de PV, la présence d'Ac anti-Dsg1 en plus des Ac anti-Dsg3 est corrélée à l'extension des lésions cutanées [Ding, 1997 ; Ishii, 1997]. Au contraire, les patients n'ayant que des Ac anti-Dsg3 ont une atteinte muqueuse pure. La topographie des lésions est en accord [Amagai, 1999b] avec la distribution relative de la Dsg1, fortement exprimée au niveau de la peau, et celle de la Dsg3 fortement exprimée sur toute l'épaisseur de la muqueuse orale et sur les couches les plus basales de l'épiderme [Amagai, 1996 ; Shirakata, 1998]. Ainsi, l'acantholyse profonde du PV est-elle souvent la conséquence d'une action combinée d'Ac dirigés contre la Dsg1 et contre la Dsg3. Les Ac anti-Dsg1 seuls n'entraînent en effet qu'une acantholyse superficielle puisque la Dsg3, présente dans les couches basales, compense la perte de la fonction d'adhésion de la Dsg1 induite par les autoAc, tandis que les Ac anti-Dsg3 seuls peuvent entraîner une perte d'adhésion dans les muqueuses du fait de l'expression prépondérante de la Dsg3 à ce niveau. La possibilité de compensation des Dsg entre-elles dans leur fonction d'adhésion cellulaire (théorie dite de la compensation) a été confirmée par l'étude d'une souris Dsg3$^{-/-}$ transgénique pour la Dsg1 caractérisée par la substitution de la Dsg3 par la Dsg1 [Hanakawa, 2002].

Les mécanismes par lesquels les Ac anti-Dsg inhibent l'adhésion interkératinocytaire ne sont pas précisés. Plusieurs mécanismes sont suggérés : l'Ac pourrait agir par un simple masquage du site d'interaction entre les Dsg au niveau de la desmoglie ou au niveau du site d'interaction entre Dsg et plaque desmosomale en mimant des séquences situées sur l'extrémité C-terminale des desmogléines [Gilbert, 1997]. Cette hypothèse de l'inhibition de la fonction d'adhésion des Dsg par les autoAc est sujette à controverse. En effet, une récente étude *in vitro* a montré que les IgG purifiées à partir du sérum de PF causent la dissociation de kératinocytes humains en culture sans inhiber les interactions des Dsg1 entre-elles par encombrement stérique mais par un autre mécanisme, très certainement lié au déclenchement de signaux cellulaires par les autoAc [Waschke, 2005].

2/ TRANSDUCTION DE SIGNAUX CELLULAIRES

Activation de protéases

Une des hypothèses permettant d'expliquer l'acantholyse induite par les autoAc au cours du pemphigus repose sur la sécrétion par les kératinocytes d'activateurs de protéases responsables de la dégradation des glycoprotéines de la desmoglie. Cette hypothèse est fondée sur la mise en évidence d'une activité protéasique et d'une sécrétion d'activateur du plasminogène par des kératinocytes en culture lors de l'adjonction d'Ac purifiés à partir du sérum de patients atteints de pemphigus [Hashimoto, 1983]. Une activité protéasique a également été mise en évidence *in vivo* dans les liquides de bulles prélevés chez des malades atteints de pemphigus. Le principal activateur sécrété est de type urokinase [Hashimoto, 1983]. Il a été montré que les Ac stimulent l'expression à la surface des kératinocytes du récepteur de l'activateur du plasminogène [Seishima, 1997]. L'activation du plasminogène entraîne la production de plasmine, enzyme protéolytique capable de digérer les protéines de la desmoglie [Schaefer, 1996 ; Xue, 1998]. Par ailleurs, des inhibiteurs de protéases et de l'urokinase (anticorps anti-urokinase, acide traxénomique, phoshatidylinositol phospholipase) sont capables d'inhiber l'acantholyse induite par les Ac de PV dans différents modèles expérimentaux de PV (souriceau BALB/c, culture de peau humaine, lignée carcinomateuse DJM-1) [Asano, 2001]. De la même façon, l'adjonction de plasminogène sur des cultures de peau humaine est capable de majorer l'acantholyse induite par ces Ac. Enfin, les kératinocytes sont capables de sécréter deux inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (dont l'un peut prévenir l'acantholyse induite par les IgG de pemphigus) qui interviendraient dans la régulation de l'activité protéasique induite par le kératinocyte.

Par ailleurs, la fixation des Ac de PV à la surface des kératinocytes induit l'activation de signaux de transduction intracellulaire pouvant être à l'origine de l'augmentation d'activité du plasminogène. En effet, sur des kératinocytes en culture, les

anticorps de PV et de PF induisent de façon spécifique une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} faisant suite à une augmentation de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) [Seishima, 1995] secondaire à l'hydrolyse de l'inositol biphosphate par la phospholipase C [Esaki, 1995]. Les Ac de PV sont également capables d'induire une activation de la Protéine Kinase C (PKC) [Kitajima, 1999 ; Osada, 1997]. L'implication de la transduction de ces signaux intracellulaires a par ailleurs fait l'objet d'une confirmation récente [Sanchez-Carpintero, 2004]. Or l'activation de la PKC est capable d'induire une augmentation d'activité des activateurs du plasminogène et l'expression de son récepteur. Il est donc proposé que l'activation du kératinocyte par les autoAc aboutit à la sécrétion d'activateurs du plasminogène [Kitajima, 1999]. Un certain nombre de données expérimentales sont cependant en contradiction avec le rôle du plasminogène dans l'acantholyse. En effet, l'augmentation de l'activateur du plasminogène est peu spécifique et a été rapportée dans d'autres lésions cutanées dépourvues d'acantholyse. Par ailleurs, une étude utilisant la microscopie confocale, l'immunomicroscopie électronique et la technique FOAM (*Fluorescent overlay antigen mapping*) a montré que la dégradation protéolytique des desmosomes est un phénomène secondaire survenant sur des desmosomes déjà dissociés [Kowalewski, 2001]. Enfin, la démonstration que le système plasminogène-plasmine, n'est pas nécessaire à l'acantholyse a été fournie par Mahoney *et al* qui ont montré qu'un souriceau nouveau-né invalidé pour le gène de l'urokinase développe des lésions de pemphigus similaires à celles d'une souris normale après transfert passif d'autoAc de PV et de PF [Mahoney, 1999b]. Ainsi, le système plasminogène-plasmine pourrait n'intervenir que secondairement dans l'acantholyse et jouer un rôle uniquement dans l'extension des lésions.

Enfin, une étude récente montre que le système kinine est activé au niveau systémique chez les patients atteints de pemphigus endémique brésilien conduisant notamment au relargage de l'activateur tissulaire du plasminogène ou encore à la synthèse de cytokines proinflammatoires (TNFα, IL1 et IL6). Il est donc possible que les enzymes impliquées dans ce système i.e., les kallikréines, puissent participer à la formation des lésions bien que cette activation enzymatique puisse aussi refléter un « réflexe » à l'inflammation cutanée [Rosatelli, 2005].

Phosphorylation des protéines desmosomales et désorganisation du desmosome

Des données récentes permettent de proposer un autre mécanisme lésionnel des autoAc : la fixation des Ac de PV à la surface des kératinocytes induirait une phosphorylation de la Dsg3 [Aoyama, 1999a] qui pourrait induire la dissociation de la Dsg3 et de la PG. Une première étude d'analyse du transcriptome de kératinocytes en culture en présence d'IgG de PV montre que la fixation des Ac à leurs cibles entraîne la

diminution de la transcription de 198 gènes notamment des protéines d'adhésion desmosomales (Dsg3, PER, DP) et l'augmentation de la transcription de 31 gènes dont celui de la collagénase. Ces travaux ont confirmé la phosphorylation autoAc dépendante de certaines molécules d'adhésion particulièrement la Dsg3 (niveau de phosphorylation augmentée de 300%) [Nguyen, 2004]. Par ailleurs, l'induction d'une acantholyse induite par les IgG de PV est impossible quant les kératinocytes en culture proviennent d'embryons de souris $PG^{-/-}$ et est restaurée après transfection des kératinocytes $PG^{-/-}$ par le gène de la PG [Caldelari, 2001]. La PG ayant un rôle de signalisation dans les phénomènes de prolifération/différentiation au niveau des épithéliums, il est proposé que les Ac de pemphigus agissent en altérant les mécanismes de différenciation cellulaire à l'origine de la constitution des desmosomes. Ainsi, les Ac anti-Dsg3 n'induiraient-ils pas une dissociation des desmosomes déjà formés, mais la formation de desmosomes anormaux dépourvus de Dsg3 comme cela a été montré sur une lignée cellulaire carcinomateuse (DJM-1) [Aoyama, 1999b]. La déplétion des desmosomes en Dsg3 pourrait être liée à la fixation des Ac sur des regroupements de Dsg3 exprimés à la membrane cellulaire avant leur intégration dans le desmosome en induisant leur internalisation dans la cellule [Sato, 2000]. Enfin, plusieurs travaux semblent indiquer que les Ac ne cliveraient pas les desmosomes déjà formés mais perturberaient les mécanismes cellulaires conduisant à la formation et au renouvellement des desmosomes [Kitajima, 1999 ; Ishii, 2001a ; Cirillo, 2006].

Une étude récente montre l'intervention d'une nouvelle cascade d'événements moléculaires mise en jeu par la fixation des Ac anti-Dsg3 : une augmentation du recyclage de la Dsg3 et de la PG exprimées à la membrane kératinocytaire qui aboutit à un appauvrissement de la réserve nucléaire en PG ; l'abrogation de la suppression de c-Myc médiée par la PG requise pour le maintien des cellules souches de l'épiderme dans leur niche et le contrôle de la différenciation kératinocytaire. Ainsi, les Ac anti-Dsg3 induisent-ils, par l'intermédiaire de la PG, la surexpression kératinocytaire de c-Myc qui est impliqué dans l'affaiblissement de l'adhésion interkératinocytaire [Williamson, 2006].

L'implication des autoAc de pemphigus dans le désassemblage du complexe desmosomal a été confirmée. La fixation des IgG purifiées des malades de PV aux kératinocytes en culture entraîne un affaiblissement de l'adhésion interkératinocytaire dû à une dissociation des desmosomes. Les complexes IgG/Dsg3 en association avec la PG sont rapidement internalisés à partir de la surface cellulaire et transportés jusqu'aux compartiments endosomiaux et lysosomiaux. Cette endocytose de la Dsg3 coïncide avec une rétraction du réseau de filaments de kératine [Calkins, 2006]. Les auteurs émettent l'hypothèse de l'intervention de la PG dans l'internalisation des cadhérines desmosomales médiée par les autoAc. Toutefois, il faut indiquer que les modifications du cytosquelette

de kératine associée à la séparation de 2 demi desmosomes n'est pas une résultante absolue de l'action des Ac anti-Dsg3 comme ont pu le démontrer *in vivo* Shimazu *et al.* En effet, l'acantholyse Ac dépendante impliquée dans le modèle murin de PV n'est pas caractérisée par la rétraction des filaments de kératine [Shimizu, 2004].

Certains mécanismes d'activation de la voie de signalisation desmosomale induite par les Ac anti-Dsg3 ont été mis en lumière. En effet, les protéines Hsp27 (*Heat shock protein 27*) et p38MAPK (*p38 mitogen activating protein kinase*) sont rapidement phosphorylées en réponse à la fixation des IgG anti-Dsg3 à leur cible. L'inhibition de l'activité de la p38MAPK prévient plusieurs effets de l'action des Ac anti-Dsg3 : la phosphorylation d'Hsp27, la rétraction des filaments de kératine et la réorganisation du réseau d'actine. L'hypothèse soulevée pour expliquer ces résultats est une cascade de signaux cellulaires qui se déroule de la manière suivante : (i) la fixation des autoAc à la Dsg3 provoque la phosphorylation de la p38MAKP ; (ii) cette dernière phosphoryle à son tour la kinase MAPKAP2 (*MAP kinase activated protein kinase 2*) ; (iii) la MAPKAP2 phosphorylée active la protéine Hsp27 par phosphorylation ; (iv) l'Hsp27 phosphorylée entraîne la réorganisation des filaments de kératine et d'actine [Berkowitz, 2005].

Les récepteurs à l'acétylcholine et l'immunopharmacologie du pemphigus [Grando, 2000] (Figure 22)

Les données obtenues par l'équipe de Grando sur la réactivité des autoAc anti-récepteur de l'ACh ont permis à ces auteurs d'émettre une théorie sur son rôle dans la physiopathologie du pemphigus. Les relations potentielles entre les Ac du pemphigus et les voies de signalisation cellulaire de l'Ach et des glucocorticoïdes sont illustrées dans la figure 23. L'action immunopharmacologique des Ac de pemphigus pourrait résider dans une altération de la régulation du développement et de l'adhésion kératinocytaire médiée par l'Ach (*via* la pemphaxine par exemple). En effet, l'Ach est un messager qui utilise différentes protéines kinases dont l'activité peut moduler de façon immédiate ou retardée les propriétés adhésives des kératinocytes. L'acantholyse résulterait des effets cumulatifs et synergiques des autoAc dirigés contre des Ag membranaires du kératinocyte : des molécules régulatrices du développement et de l'adhésion (i.e. les récepteurs à l'Ach) et des molécules d'adhésion cellulaire (i.e. les cadhérines desmosomales).

Plusieurs arguments soulignent l'action stimulatrice des glucocorticoïdes sur l'axe de signalisation de l'Ach telle que l'augmentation de l'expression kératinocytaire de la pemphaxine par la méthylprédnisolone. Ainsi, cette capacité des glucocorticoïdes pourrait expliquer leur effet anti-acantholytique observé *in vitro* sur des cultures d'explant de peau humaine. A cet égard, l'analyse du transcriptome de kératinocytes traités par la méthylprénisolone montre que cette molécule a des effets réciproques par rapport à ceux

induits par les IgG de malades atteints de PV : elle augmente l'expression de 14 gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose ainsi que pour des marqueurs de différenciation. La méthylprénisolone bloque l'effet acantholytique des IgG de PV et abolit la phosphorylation des molécules d'adhésion comme la Dsg3 induite par ces autoAc. Par ailleurs, les analyses par immunoempreinte montrent qu'elle augmente l'expression des cadhérines E (235%), de la Dsg1 (228%) et de la Dsg3 (148%) [Nguyen, 2004].

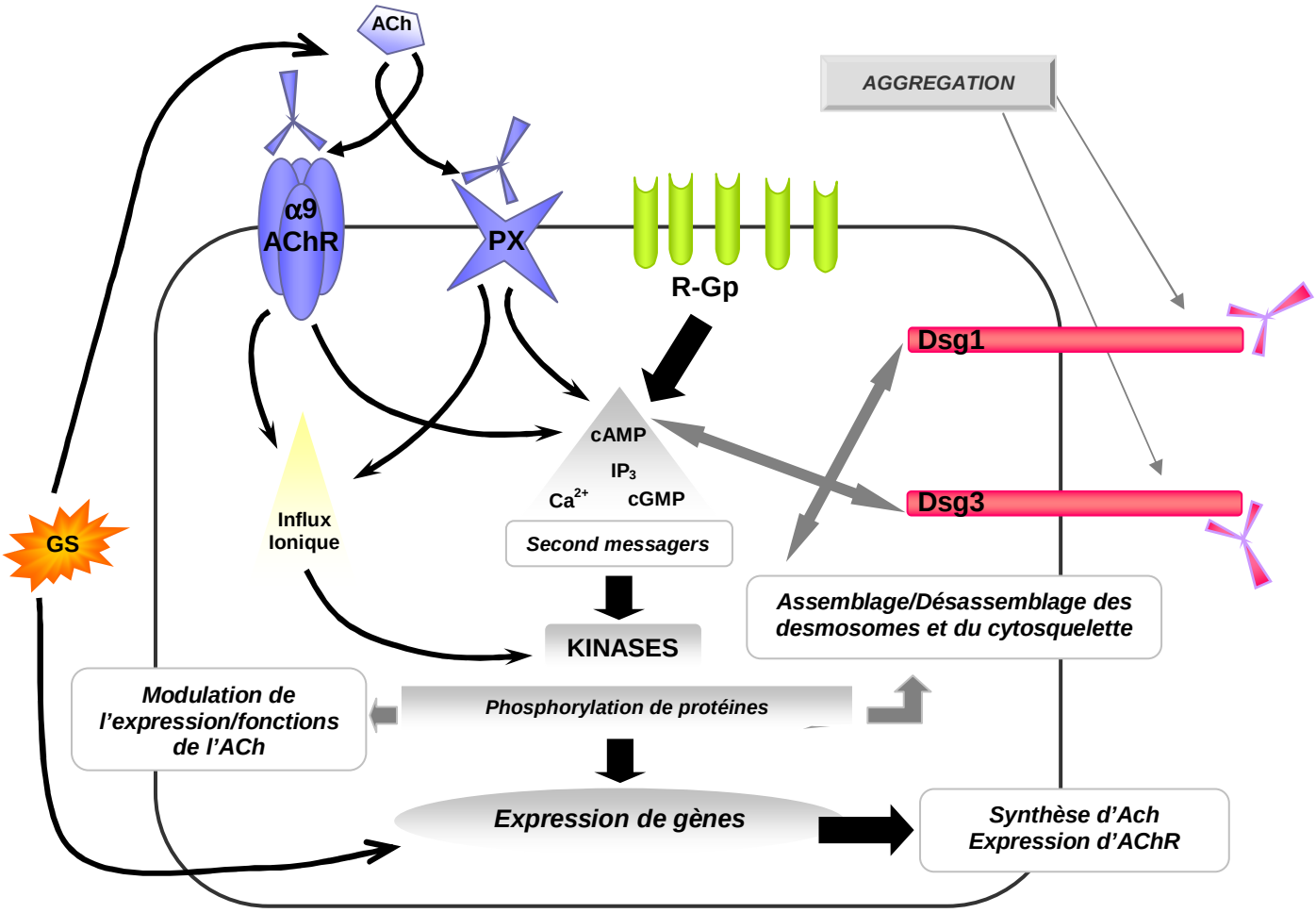


Figure 22. Immunopharmacologie du pemphigus. Ce schéma illustre les mécanismes biochimiques intracellulaires potentiellement impliqués dans les effets acantholytiques des autoAc du pemphigus et des effets anti-acantholytiques des glucocorticoïdes (GS) et des cholinomimétiques. ACh, acétylcholine ; AChR, récepteurs à l'ACh ; Dsg, desmogléines ; Gp, protéine G ; IP_3, inositol triphsphate ; PX, pemphaxine.

3/ APOPTOSE KERATINOCYTAIRE

Le déclenchement de l'apoptose kératinocytaire induite par les autoAc anti-Dsg est un mécanisme lésionnel suspecté dans le processus acantholytique [Milner, 1999]. Il a été montré que la plupart des kératinocytes de la couche suprabasale de la peau périlésionnelle d'un patient atteint de PV sont en voie d'apoptose. Le sérum du malade est caractérisé par une concentration élevée en ligand de la molécule Fas et provoque l'apoptose de kératinocytes normaux en culture par un mécanisme dépendant de l'activation de la caspase 8 [Puviani, 2003]. I*n vitro*, quand les cultures de kératinocytes HaCaT sont traitées avec les IgG isolées d'un patient atteint de PV (de type cutanéomuqueux) et dirigées contre la Dsg3, la Dsg1 et la PG, une acantholyse des kératinocytes est observée, associée à une augmentation de l'apoptose. Ce processus apoptotique est caractérisé par une activation de la caspase 3, une diminution de l'expression de Bcl-2 et une augmentation de celle de Bax [Pelacho, 2004]. Ces résultats ont été étayés par la démonstration que l'apoptose des kératinocytes observée au niveau des lésions de PV survient préalablement à l'acantholyse et que les IgG des malades atteints de PV (Ac : $Dsg3^{+}$ $Dsg1^{+/-}$) induisent l'apoptose des kératinocytes normaux et des lignées de kératinocytes HaCaT et A431. Cette apoptose des kératinocytes en culture est caractérisée par : (i) une sécrétion du ligand de Fas (FasL) soluble dans le milieu de culture ; (ii) une concentration intracellulaire augmentée en molécules Fas et FasL (soluble et membranaire) et en protéines pro-apoptotiques p53 et Bax, ainsi qu'une diminution de l'expression de Bcl-2 ; (iii) un enrichissement de ces cellules en caspase 8 et une activation des caspases 1 et 3 ; (iv) une agrégation des molécules Fas et FasL avec la caspase 8 aboutissant à la formation du complexe DISC (*Death-inducing signaling complex*) à la surface kératinocytaire [Wang, 2004b]. Par ailleurs, cette mort kératinocytaire induite par les IgG anti-Dsg3/Dsg1 et dépendante de Fas est exacerbée dans les cultures de kératinocytes sénescents suggérant que la fréquence et la sévérité de la maladie observées chez les sujets âgés sont corrélées à une susceptibilité accrue à ce processus apoptotique [Wang, 2004c]. Enfin, l'incubation de kératinocytes humains avec le captopril, un inhibiteur de l'enzyme ACE (*Angiotensin-converting enzyme*) utilisé comme anti-hypertenseur et capable d'induire un pemphigus de type médicamenteux, provoque une apoptose similaire à celle observée avec le sérum de patient atteint de PV aboutissant *in fine*, à une surexpression de la protéine de choc thermique Hsp70 et de l'enzyme iNOS (surproduction de monoxyde d'azote) ainsi qu'à une inhibition de la transglutaminase kératinocytaire [Baroni, 2004]. L'ensemble de ces données plaide en faveur du rôle apoptotique des IgG dirigées contre des Dsg et de la participation de ce phénomène de mort cellulaire programmée à la perte de l'adhésion interkératinocytaire à l'origine des pemphigus et laisse entrevoir la possibilité d'un développement thérapeutique. A ce

propos, l'équipe de Grando a découvert un nouveau mode d'action des immunoglobulines intraveineuses (IgIV) utilisées pour le traitement des pemphigus qui passerait par l'augmentation de l'expression de 2 inhibiteurs de l'apoptose : les protéines FLIP (*FLICE inhibitory protein*) et calpastatine qui inhibent respectivement l'activité des caspases et de la calpaïne [Arredondo, 2005].

IV. GENETIQUE DES PEMPHIGUS

A- L'association au *locus* HLA

Plusieurs arguments font suspecter une susceptibilité génétique à la maladie. Des cas de pemphigus familiaux, bien que rares, ont été décrits [Revenga-Arranz, 1996]. Des autoAc sont trouvés dans 40 à 70% des cas dans le sérum des collatéraux de patients atteints de pemphigus [Brandsen, 1997]. La transmission de ce phénotype partiel est fortement liée à la transmission des haplotypes HLA de susceptibilité au PV [Ahmed, 1993]. La différence entre patients et collatéraux réside dans le titre des autoAc qui est plus faible chez les apparentés indemnes, et dans leur isotype IgG4 qui n'est jamais observé chez les apparentés [Ahmed, 1993; Brandsen, 1997; Kricheli, 2000]. Ces résultats évoquent l'intervention de facteurs génétiques de transmission mendélienne, et plus particulièrement du CMH, dans la capacité à produire des autoAc non pathogènes, alors que d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux, seraient nécessaires au passage vers la pathogénicité (commutation de classe vers les IgG4, augmentation du titre des autoAc). Par ailleurs, le PV est plus fréquent dans certains groupes ethniques, en particulier chez les juifs ashkénazes [Simon, 1980]. En Afrique du Sud, la répartition du PV et du PF est très différente en fonction de l'origine ethnique (80% des patients atteints de PV sont d'origine indienne et 80% des patients atteints de PF sont noirs) [Aboobaker, 2001]. Le pemphigus endémique brésilien (*fogo selvagem*) sévit avec une fréquence très augmentée dans certaines régions d'Amérique du Sud [Diaz, 1989] et illustre le double rôle de l'environnement et de la génétique dans le déterminisme de la maladie, puisque plus de la moitié des personnes vivant en zone d'endémie serait porteuse d'Ac non pathogènes et que la maladie ne se développerait que chez les sujets porteurs des gènes HLA de susceptibilité [Warren, 2000]. Enfin, l'argument déterminant repose sur la forte association entre le pemphigus et certains Ag du complexe majeur d'histocompatibilité essentiellement de classe II [Ahmed, 1990 ; Ahmed, 1991]. Cette association du PV à certains allèles HLA de classe II a été révélée en 1980 puis constamment confirmée par des études réalisées dans différentes ethnies (Tableau 14). La démonstration de l'association du PS avec les allèles HLA de classe II est plus récente et a été faite dans les formes sporadique et endémique de la maladie (Tableau 15).

Tableau 14. Allèles HLA de susceptibilité au pemphigus vulgaire

Populations	n		Allèles
	Contrôles	Patients	
Caucasoïdes			
Juifs ashkénazes		26	DR4, DQw8
Français	106	37	DRB1*0402, 1401; DQB1*0302; 0503
Indiens	89	37	DRB1*1404 ; DRB1*0202; DQA1*0101; DQB1*0503
Italiens	128	61	DRB1*0402, DRB1*1401; DQB1*0503
Sardes	–	16	DRB1*0402; DQA1*0301 ; DQB1*0302
Pakistanais	–	19	DRB1*1404; DQA1*0101; DQB1*0503
Espagnols	200	26	DRB1*0402, 1401; DQB1*0503, 0302
Américains	44	38	DR4
Mongoloïdes Japonais	525	55	DRB1*0403, 0406; DRB1*1401, 1405, 1406

Tableau 15. Allèles HLA de susceptibilité au pemphigus superficiel

Populations	n		Allèles
	Controles	Patients	
PS sporadique			
Français	106	20	DRB1*0404 ; DRB1*0102
Italiens	128	26	DRB1*04 ; DRB1*1404 ; DQB1*0503
Japonais	525	7	DRB1*04 ; DRB1*0403, *0406 DRB1*14; DRB1*1401, *1405, *1406
PS endémique			
Brésiliens	182	147	DRB1*0101, *0102, *0103 ; DRB1*0404, *0406, *0410 ; DRB1*1406, *1601
	50	38	DRB1*0102
Tunisiens	100	28	DR4

Certains gènes HLA de classe I ont été décrits avec une plus grande fréquence chez les patients atteints de pemphigus. Ainsi, la fréquence des Ag HLA-A10 et de son sous-type A26 est-elle augmentée chez les patients d'origine juive et japonaise, atteints de pemphigus vulgaire ou foliacé. Chez les malades d'origine espagnole, la fréquence du sous-type HLA-B28 est significativement augmentée [Gonzales-Escribano, 1998]. Par ailleurs, les ADN de patients juifs et de sujets sains porteurs des allèles de susceptibilité au PV à l'aide de marqueurs « microsatellite » recouvrants la totalité du *locus* du CMH ont été analysés. Quatre allèles localisés dans une région HLA de classe I proche du *locus* HLA-A ont été identifiés comme associés à la maladie [Slomov, 2003]. Une étude plus approfondie utilisant 26 marqueurs SNP (couvrant une région chromosomique de 6.10^5 pb) révèle que les 4 marqueurs informatifs sont localisés dans le gène HLA-G [Gazit, 2004]. En particulier, un variant allélique correspondant à une insertion/délétion de 14 pb dans l'exon 8 de ce gène est associé à la maladie. Chez la majorité des patients (porteurs de la délétion), la perte du fragment de 14 pb, que l'on sait être corrélée à une augmentation de la stabilité des ARNm HLA-G, pourrait conduire à une surexpression de ces molécules et *in fine* à une rupture de la tolérance vis à vis des Ag du soi.

Cependant, ce sont les gènes HLA de classe II qui semblent être le plus associés à la maladie. En effet, il a été montré dans différents groupes ethniques que les génériques DR4 et DR14 qui sont en déséquilibre de liaison avec respectivement les allèles DQB1*0302 et DQB1*0503, constituent des facteurs de prédisposition à la maladie. L'allèle DRB1*0402 (un des allèles DR4) est le principal allèle de susceptibilité au PV retrouvé chez les Juifs ashkénazes (92%), et dans d'autres populations comme les Américains non juifs, les Iraniens (85%), les Italiens (33%), les Espagnols et les Sardes (81%). Au Japon, d'autres allèles DR4 ont été trouvés en association avec le PV (DRB1*0403, *0404 et *0406). Pour les populations non juives, ce sont DR14 (DRB1*1401 et *1404) qui apparaissent comme les principaux allèles de susceptibilité comme cela a été montré chez les Américains caucasiens non juifs, chez les Européens, les Italiens, les Sardes, les Indiens et les Pakistanais. Dans les études japonaises, 2 autres allèles DR14, DRB1*1405 et *1406, sont associés au PV et montrent aussi le rôle de prédisposition de DRB1*1401 [Ahmed, 1990 ; Ahmed, 1991 ; Yamashina, 1998].

L'association au *locus* HLA de classe II est aussi établie pour les PS notamment le pemphigus endémique brésilien où un allèle DR1 ainsi que des allèles DR4 et DR14 sont incriminés. En effet des études réalisées au Brésil au sein de populations non amérindiennes et de différentes tribus indiennes ont permis d'identifier DRB1*0102, DRB1*0404 et DRB1*1402 et 1406 comme les allèles de susceptibilité à la maladie [Moraes, 1997 ; Hans-Filho, 1999]. Récemment, une large étude cas-témoins menée au

sein de la population brésilienne a révélé le rôle des interactions alléliques dans la susceptibilité/résistance à la maladie. Celle-ci confirme les associations positives déjà connues, met en évidence d'autres allèles de susceptibilité (DRB1*0101, *0103; DRB1 *0410 et DRB1 *1601) et indique que certains allèles confèrent la protection (DRB1*0301; DRB1*0701; DRB1*0801; DRB1*1101, *1104 et DRB1*1402). Les allèles de susceptibilité sont semi-dominants par rapport aux allèles neutres et, les allèles protecteurs semi-dominants par rapport aux allèles susceptibles et dominants par rapport aux allèles neutres [Pavoni, 2003]. Cette étude met donc l'accent sur le rôle crucial des gènes HLA-DRB1 dans la modulation de la susceptibilité et de la protection au pemphigus. Trois études concernent la forme sporadique de PS. De l'étude réalisée en France [Loiseau, 2000], il ressort une association avec deux des allèles de susceptibilité au *fogo selvagem* : DRB1*0102 et DRB1*0404. Des études réalisées en Italie [Lombardi, 1999] et au Japon [Miyagawa, 1999b], il ressort une association avec des allèles précédemment décrits en association avec le PV : DRB1*0402 et DRB1*1401 en Italie, DRB1*0406 et DRB1*1401 au Japon. Concernant le pemphigus tunisien, des études préliminaires montrent une association avec l'haplotype DR4. Certaines de ces études mettent en exergue le rôle protecteur de certains allèles HLA de classe II tels que DRβ1*13 et DRβ1*07 respectivement chez les malades espagnols [Gonzales-Escribano, 1998] et italiens [Lombardi, 1996].

Le *locus* HLA de classe II est aussi impliqué dans le déterminisme génétique d'une troisième forme de pemphigus, le PPN. En effet, notre groupe a démontré que l'allèle DRB1*03 est significativement augmenté chez les malades (61,5%) comparés aux sujets contrôles (21%), aux malades atteints de PV (3%) et de PF (6%,). Il est intéressant de remarquer que les génériques DR4 et DR14 qui sont associés aux PS et au PV ne sont pas impliqués dans la susceptibilité génétique au PPN. Une hypothèse séduisante est que chez les malades, les molécules HLA DRB1*03 pourraient permettre la présentation de peptides dérivés des protéines de la famille plakines aux cellules T autoréactives [Martel, 2003].

L'association entre HLA et MAI ne relève pas d'un mécanisme univoque puisqu'elle peut rendre compte du rôle propre des molécules HLA mais aussi d'un autre gène de susceptibilité en déséquilibre de liaison avec les gènes du CMH. De plus, le déséquilibre de liaison entre les gènes HLA de classe II eux-mêmes, et particulièrement entre les *locus* DR et DQ, ne permet pas, à la vue des seules études d'association de déterminer quel allèle est responsable de la susceptibilité. Les études fonctionnelles de prolifération vis à vis de l'autoAg s'avèrent ici particulièrement informatives, puisqu'en testant la prolifération des lymphocytes T de patients dans différents contextes HLA de classe II, elles permettent d'étudier le rôle des molécules de prédisposition dans la présentation de

l'autoAg aux lymphocytes T autoréactifs. Les résultats de ces études plaident en faveur du rôle direct des molécules DR de susceptibilité dans la présentation de l'autoAg. Wucherpfennig *et al* ont été les premiers à montrer que la prolifération des lymphocytes T provenant de patients atteints de PV est restreinte par la molécule DRB1*0402 [Wucherpfennig, 1995]. Lin *et al* ont confirmé ce résultat et montré une restriction par la molécule DRB1*1401 et une absence de restriction par les molécules DQ ou DP [Lin, 1997]. Hertl *et al* ont quant à eux montré que si DRB1*0402 est capable de restreindre la réponse T chez certains patients, des allèles ayant une séquence proche mais appartenant au groupe DR11 ainsi que l'allèle DQB1*0301 peuvent également présenter des peptides de Dsg3 aux lymphocytes T [Hertl, 1998a]. Ces auteurs ont démontré que la reconnaissance de peptides de la Dsg3 par les clones T spécifiques isolés chez les patients atteints de PV et chez les sujets sains porteurs des allèles de susceptibilité au PV est restreinte par les molécules HLA DRB1*0402 et/ou DQB1*0503 [Hertl, 1998b ; Veldman, 2004b]. La totalité des peptides identifiés dans l'étude comporte des résidus aminoacides conservés en position 1, 4 et 6 avec un aminoacide de charge positif (Arginine ou Lysine) en position 4 qui constitue potentiellement un motif d'ancrage aux molécules DRB1*0402 [Veldman, 2004b]. La réactivité lymphocytaire T dirigée contre les différents épitopes de la Dsg3 est restreinte par les molécules HLA de classe II et est indépendante du développement de la maladie puisqu'elle est aussi présente chez les sujets sains. Enfin, dans le PS endémique, la réponse proliférative T est restreinte par les molécules HLA-DR [Lin, 2000].

D'autres arguments plaidant en faveur du rôle direct des gènes HLA de classe II de susceptibilité proviennent de l'analyse des différentes molécules HLA impliquées dans le PV. En effet, ces molécules partagent des caractéristiques structurales, en particulier, des résidus conservés au niveau des positions de la poche HLA impliquées dans la liaison peptidique. Ces résidus sont retrouvés en position 26, 67, 70, 71 et 86 de la chaîne β de la molécule DR [Miyagawa, 1999b]. De plus, par des techniques de mutagenèse dirigée, il a été démontré que la charge négative de la poche P4 de la molécule DRB1*0402, dûe à un acide glutamique en position β71, est nécessaire à la présentation sélective de peptides issus de la Dsg3 (Figure 23) [Wucherpfennig, 1995]. Ce concept de propriétés communes aux allèles HLA de classe II de susceptibilité, a initialement été appliqué au pemphigus endémique brésilien pour lequel tous les allèles de susceptibilité rapportés partagent un épitope commun (*shared epitope*) en position 67-74 de la chaîne β de la molécule DR. Pris isolément, cet épitope constitue le facteur de susceptibilité le plus significatif à la maladie [Moraes, 1997].

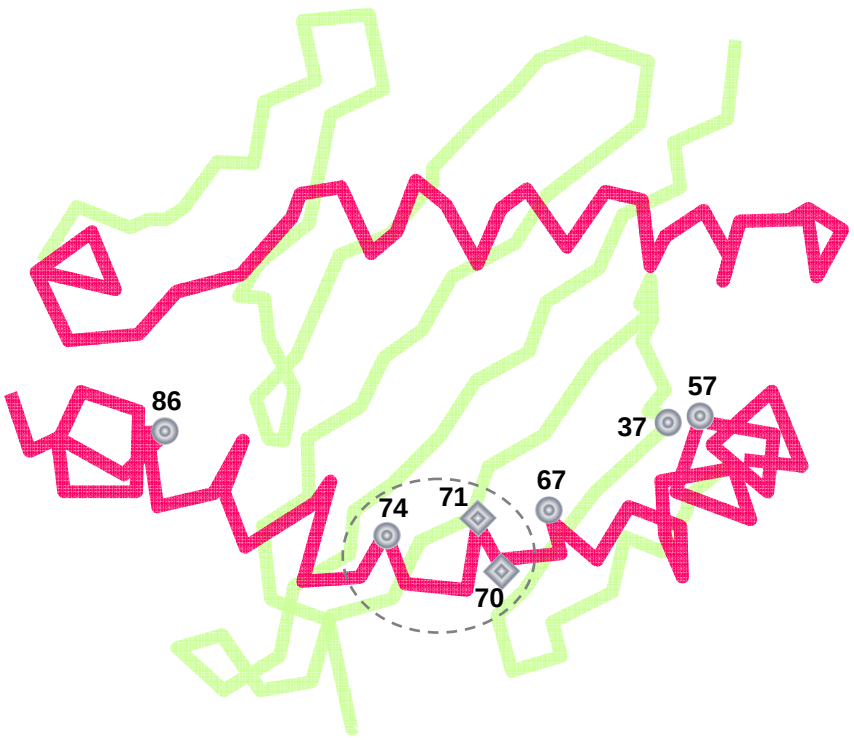


Figure 23. Position des résidus polymorphiques de la chaîne β dans la poche d'ancrage des peptides de la molécule HLA-DR. Dans la molécule DRβ1*0402, les résidus DRβ 70 et 71 possèdent une charge négative et sont localisés dans poche P4 (cercle pointillé). La molécule DRβ1*0402 ainsi que la molécule apparentée *0414 sont les seuls allèles DR4 à avoir des résidus DRβ 70 et 71 à charge négative dans la poche P4 qui sont très certainement responsables de la fixation de peptides provenant de la Dsg3. Tous les autres sous-types DR4 ont une charge positive à la position DRβ71.

Si les gènes HLA semblent jouer un rôle significatif dans la susceptibilité au pemphigus, ils n'expliquent vraisemblablement pas à eux seuls le déterminisme de la maladie. En effet, il a été montré que des sujets sains ainsi que des collatéraux de patients atteints de PV, et portant les allèles HLA de susceptibilité ont des anticorps anti-SIC détectables en IFD et en IFI à un titre cependant plus faible que chez les malades [Mohimen, 1993] ainsi que des lymphocytes T sanguins dirigés contre la Dsg3, sans présenter de lésion clinique de pemphigus. D'autres facteurs, génétiques ou environnementaux sont donc probablement nécessaires à la production d'Ac pathogènes. Pour ce qui est des facteurs d'environnement, le rôle des médicaments [Ruocco, 1993] (un certain nombre de médicaments en particulier les thiolés comme la pénicillamine, étant reconnu comme facteur déclenchant de certains PS : cf. pemphigus médicamenteux), des virus, de certains aliments (ail), des brûlures ainsi que l'exposition aux UV a été évoqué dans le déterminisme de la maladie. Des éléments d'explication pourraient venir de l'étude des différentes associations morbides décrites au cours du pemphigus :

association entre pemphigus et d'autres MAI (en particulier myasthénie, lupus et PR), association entre pemphigus et cancers (thymomes et syndrome lymphoprolifératifs) [Udey, 1999]. L'expression anormale (qualitativement ou quantitativement) au niveau des cellules tumorales et en particulier des lymphocytes B tumoraux au cours des hémopathies lymphoïdes constitue à cet égard une voie de recherche. Enfin, le modèle du PS brésilien pourrait se révéler particulièrement informatif. En effet la zone d'endémie correspond à l'habitat d'une mouche piqueuse (*black fly*) [Eaton, 1998 ; Sampaio, 1994]. Il a été proposé que le *fogo selvagem* serait, chez des sujets présentant un terrain génétique de prédisposition, la conséquence d'une réaction initiée par un mimétisme moléculaire entre un agent infectieux transmis par l'insecte et la Dsg1 (cf facteurs environnementaux des pemphigus). La forte incidence des Ac anti-Dsg1 (55% de la population) et celle plus faible des Ac anti-Dsg3 (36% de la population) trouvée dans la population générale vivant en zone d'endémie, alors que la maladie ne se développe que chez les sujets porteurs des haplotypes HLA de susceptibilité, parait compatible avec cette hypothèse [Warren, 2000 ; Hilario-Vargas, 2006].

B- Le polymorphisme génique des desmogléines

La description d'un polymorphisme du gène *DSG1* chez le bovin [Puttagunta, 1994], nous a incité à examiner la possibilité du rôle d'un variant polymorphique du gène codant la Dsg1 humaine dans le déterminisme génétique de la maladie. Nous avons d'abord mis en évidence un polymorphisme du gène *DSG1*, localisé sur l'exon 7 qui code avec les exons 5 et 6 pour le domaine EC2 de la protéine (Figure 12). Ce polymorphisme consiste en un SNP en position 809 (substitution d'une thymine par une cytosine). Par une approche de type gène candidat et dans une étude cas-contrôles portant sur 31 patients français atteints de PF et 84 contrôles, il a été observé que la maladie est associée à l'allèle C (809) et de façon plus spécifique, au génotype 809 homozygote (C/C) (Figure 24*A*) [Martel, 2001b]. Nous avons retrouvé cette association chez les malades tunisiens (n=49), chez lesquels il existe une augmentation significative de la fréquence du génotype C/C (809) comparée aux témoins (42,9% *vs* 22%). Ainsi, le génotype C/C du SNP (809) identifié comme facteur de susceptibilité au PF en France, intervient-il également dans la susceptibilité au pemphigus endémique tunisien [Ben Ayed, 2002]. La distribution de ce variant allélique a aussi été comparée entre 134 patients atteints de pemphigus brésilien et 227 sujets contrôles. Bien qu'une tendance vers une augmentation de la fréquence du SNP (809) (p=0.078) et du génotype C/C 809 soit observée chez les malades, la différence n'est pas statistiquement significative suggérant que ce polymorphisme de la Dsg1 n'intervient probablement pas dans le déterminisme génétique du *fogo selvagem* [Petz-Erler, 2005].

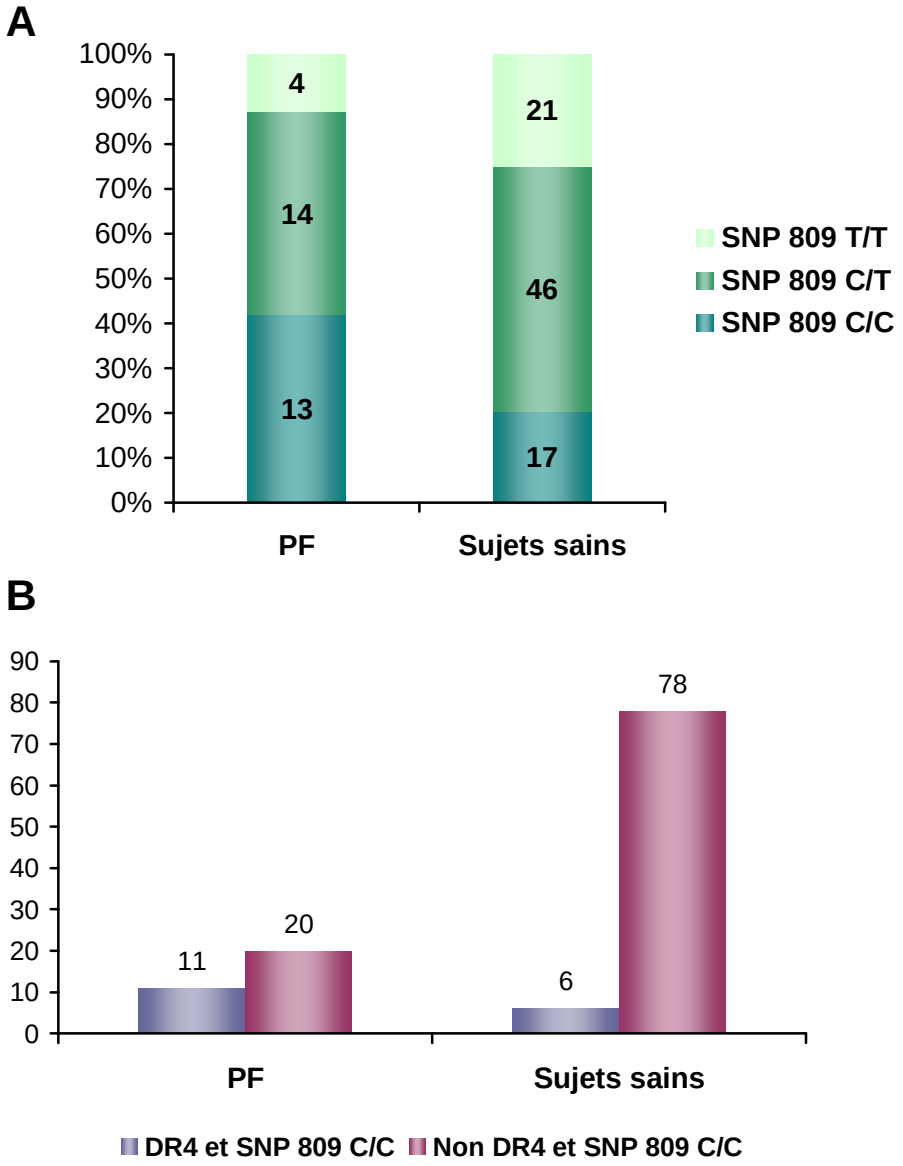


Figure 24. Distribution génotypique du SNP 809 et de la combinaison DR4/SNP809 C/C chez les malades atteints de pemphigus foliacé et chez les sujets sains. Le diagramme *A* représente la distribution génotypique du SNP 809 chez les malades caucasiens (n=31) atteints de PF et les sujets sains caucasiens (n=84). La fréquence du SNP 809 à l'état homozygote (C/C) apparaît augmentée chez les patients (41,9%) par rapport aux contrôles (20,2%) (p=0,03). Ce marqueur polymorphe est donc associé au PF. Le diagramme *B* montre la distribution de la combinaison DR4/SNP809 C/C chez les patients atteints de PF (n=31) et chez des sujets sains (n=84) et indique que cette combinaison génétique est un facteur de risque à la maladie ($p=1.10^{-4}$).

Comme précédemment cité, les génériques DR4 et DR14 sont associés au PS. Soixante quatorze pour-cent des patients portent au moins un de ces allèles contre seulement 38,1% des témoins. Notre analyse de la distribution relative des facteurs de risque DRB1*04 et génotype C/C (809) a montré que ces deux facteurs ne se répartissent pas, chez les patients, de façon aléatoire l'un par rapport à l'autre. En effet, la

comparaison des risques relatifs conférés par ces facteurs et une étude statistique par régression logistique ont démontré une interaction synergique dite épistatique entre ces deux facteurs de risque et que leur combinaison augmente de manière significativement plus forte l'association à la maladie (Figure 24*B*) [Martel, 2001b]. Cette interaction épistatique est donc une combinaison des deux facteurs de risques, l'allèle DRB1*04 et le génotype C/C (809), qui fournit le plus fort facteur de prédisposition à la maladie comparé au risque conféré par chacun des facteurs pris individuellement. Dans l'état actuel de nos connaissances, rien ne permet d'affirmer que ce SNP est fonctionnel et qu'il n'exerce pas son rôle de prédisposition en raison d'un déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme situé sur le gène *DSG1* (sur une région codante ou sur une région régulatrice), voire sur un gène proche. Cependant, de façon intéressante, ce polymorphisme est situé sur une région codante du gène *DSG1*, contrairement aux polymorphismes de l'insuline ou du récepteur à l'ACh impliqués dans le diabète de type 1 et la myasthénie et qui siègent respectivement en 5' du gène *INS* et sur le premier intron du gène *CHRNA*. Cependant, la substitution T/C (809) est une substitution silencieuse si bien que malgré sa situation sur une région codante, le rôle du SNP (809) ne peut s'expliquer par une modification directe de la séquence de l'autoAg.

La recherche de polymorphisme sur le gène codant la Dsg3 a établi la présence de 46 SNP sur le gène *DSG3*. Cinq d'entre eux ont été sélectionnés puis analysés dans une étude cas-témoins comportant 90 patients atteints de PV dont 62 d'origine nord-européenne et 28 d'origine nord-indienne et 2 groupes contrôle des mêmes ethnies (154 nord-européens et 98 nord-indiens). Les analyses de la distribution relative des haplotypes définis par ces 5 marqueurs polymorphes ont montré une association significative entre l'haplotype DSG3*TCCTC et les malades nord-européens et entre l'haplotype DSG3*TCCCC et les malades indiens [Capon, 2006].

C- Autres gènes candidats

L'intervention d'autres gènes du *locus* HLA dans la prédisposition au pemphigus a été étudiée. La variabilité génétique des gènes du *Tumor necrosis factor* (TNF) et de la *Lymphotoxin alpha* (LTA) localisés dans la région HLA de classe III, a été analysée dans une étude cas-témoins comprenant une large série de patients atteints de *fogo selvagem*. Cependant, aucune association entre un variant polymorphe de ces gènes et la maladie n'a été mise en évidence indiquant que la variabilité génétique de ces deux cytokines aux propriétés immunorégulatrices ne participe pas à la susceptibilité/résistance au pemphigus endémique brésilien [Roxo, 2003]. Toutefois, une étude a montré une association positive entre un polymorphisme localisé dans le promoteur du gène *TNFa* et le PS [Torzecka, 2003]. Aucun polymorphisme des gènes *TAP1* et *TAP2* localisés dans le

locus HLA de classe II et qui codent pour des transporteurs associés à l'apprêtement des Ag, n'intervient dans la susceptibilité au pemphigus chez les malades japonais [Niizeki, 2004]. Certains gènes de cytokines mises en cause dans la physiopathologie du pemphigus, ont été étudiés. Un SNP localisé en position 174 du gène *IL6* est associé à la survenue du *fogo selvagem* : le génotype C/C étant protecteur et l'allèle G prédisposant à la maladie [Pereira, 2004]. Par ailleurs, cette étude montre qu' aucun variant polymorphique des gènes codant pour l'IL1α, l'IL1β, ou leur antagoniste (IL1Ra), l'IL10, l'IL4 et son récepteur (IL4R) n'est associé à la survenue du PS brésilien.

Il est légitime de concevoir que certains gènes impliqués dans le contrôle des voies de régulation de la réponse immune puissent participer à la susceptibilité au pemphigus. Une étude cas-témoins récente a testé cette hypothèse par l'analyse de variants alléliques de 2 molécules impliquées dans les processus d'apoptose, TP53 et BAX. Néanmoins, aucune variation allélique et génotypique n'a été mise en évidence entre les patients atteints de pemphigus brésilien et les sujets contrôles [Kohler, 2006].

Enfin, Pavoni *et al* ont comparés les fréquences alléliques et génotypiques de 2 SNP localisés sur le gène *CTLA4* entre une cohorte de malades atteints de *fogo selavagem* (n=118) et une population de sujets contrôles (n=291). Bien que le polymorphisme génique de la molécule CTLA4 prédispose à plusieurs MAI, les variations alléliques du promoteur et l'exon 1 du géne *CTLA4* ne sont pas associées à la survenue du *fogo selvagem* [Pavoni, 2006].

V. LA REPONSE LYMPHOCYTAIRE T AU COURS DES PEMPHIGUS

Certains auteurs ont montré la présence chez des patients atteints de pemphigus de clones T circulants capables de reconnaître l'autoAg sous forme recombinante ou peptidique, c'est à dire la Dsg3 dans le PV et la Dsg1 dans le *fogo selvagem* [Lin, 1997 ; Hertl, 1998a ; Hertl, 1998b ; Lin, 2000 ; Nishifuji, 2000]. Ces clones correspondent à des lymphocytes T CD4+ mémoires sécrétant des cytokines de type Th2 (IL4, IL6 et IL10) impliquées dans la commutation de classe vers les IgG4, sous-classe principale des Ac pathogènes dans le pemphigus. L'implication de lymphocytes T CD4+ ayant un profil Th2 a été confirmée par l'étude en immunohistochimie de l'infiltrat cellulaire présent dans des lésions de PV et de PF [Caproni, 2001 ; Santi, 2001]. La cartographie épitopique T de la Dsg3 a été entreprise grâce à l'utilisation de peptides synthétiques et de protéines recombinantes tronquées. De multiples épitopes T ont été identifiés, répartis sur les segments EC1 à EC5 de la région EC de la desmogléine 3 (Figure 25). L'hypothèse avancée pour rendre compte de cette diversité est que la réponse T pourrait être initiée contre un épitope immunodominant et que des phénomènes d'extension épitopique viendraient secondairement diversifier cette réponse. L'évolution d'une réponse

initialement dirigée contre la Dsg3 vers une réponse dirigée à la fois contre la Dsg3 et la Dsg1 au cours du PV en est une illustration. L'étude de la dichotomie des cellules T anti-Dsg3 de type Th1 et Th2 chez les patients atteints de PV et chez des sujets sains porteurs des allèles HLA DRβ1*0402 et DQβ1*0503 montre que : (i) l'expression de ces molécules HLA de susceptibilité au PV est essentielle pour la reconnaissance des peptides de la Dsg3 chez les patients et les sujets sains ; (ii) ces derniers ne présentent qu'une réponse anti-Dsg3 de type Th1 ; (iii) chez les malades, la fréquence des cellules Th1 est augmentée durant la phase chronique de la maladie ; (iv) l'émergence de cellules Th2 anti-Dsg3 est restreinte aux malades et fondamentale pour la production des autoAc anti-Dsg3 [Veldman, 2003]. L'association entre la réponse lymphocytaire Th2 anti-Dsg3, la production d'autoAc et l'activité du PV a été récemment confirmée [Rizzo, 2005]. Les données de cartographie épitopique de la région EC complète de la Dsg3 montrent que 86% des clones T étudiés (n=97) réagissent avec un nombre limité de peptides. Cinq peptides localisés sur les domaines EC1 et EC2 sont reconnus à la fois par les clones isolés chez les patients ou chez les sujets sains porteurs des allèles DRB1*0402 ou DQB1*0503; deux peptides du domaines du domaine EC3 et un peptide du domaine EC5 sont reconnus par les clones T isolés respectivement chez les patients et chez les sujets sains (Figure 25). Il est intéressant de noter que la majorité des clones T anti-Dsg3 (47, 4%) réagissent contre le peptide 96-112 de la protéine qui constitue l'épitope immunodominant de la réponse autoAc au cours de la maladie. Par ailleurs, ces réactivités sont restreintes par les molécules HLA de prédisposition au PV et aucun processus d'extension épitopique intramoléculaire ne semble participer à la diversification de la réponse T puisqu'il n'existe aucune corrélation entre phénotype clinique et spécificité des peptides reconnus par les clones T anti-Dsg3 [Veldman, 2004b] (Figure 26).

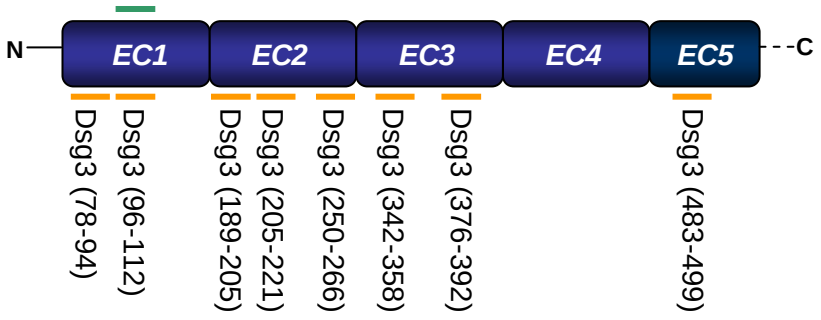


Figure 25. Cartographie épitopique T des domaines extracellulaires de la desmogléine 3. Plusieurs épitopes répartis sur la région extracellulaire de la Dsg3 sont reconnus par les clones lymphocytaires T isolés de patients atteints de PV (orange). L'épitope immunodominant ciblé par la réponse autoAc est indiqué sur le domaine EC1 (vert).

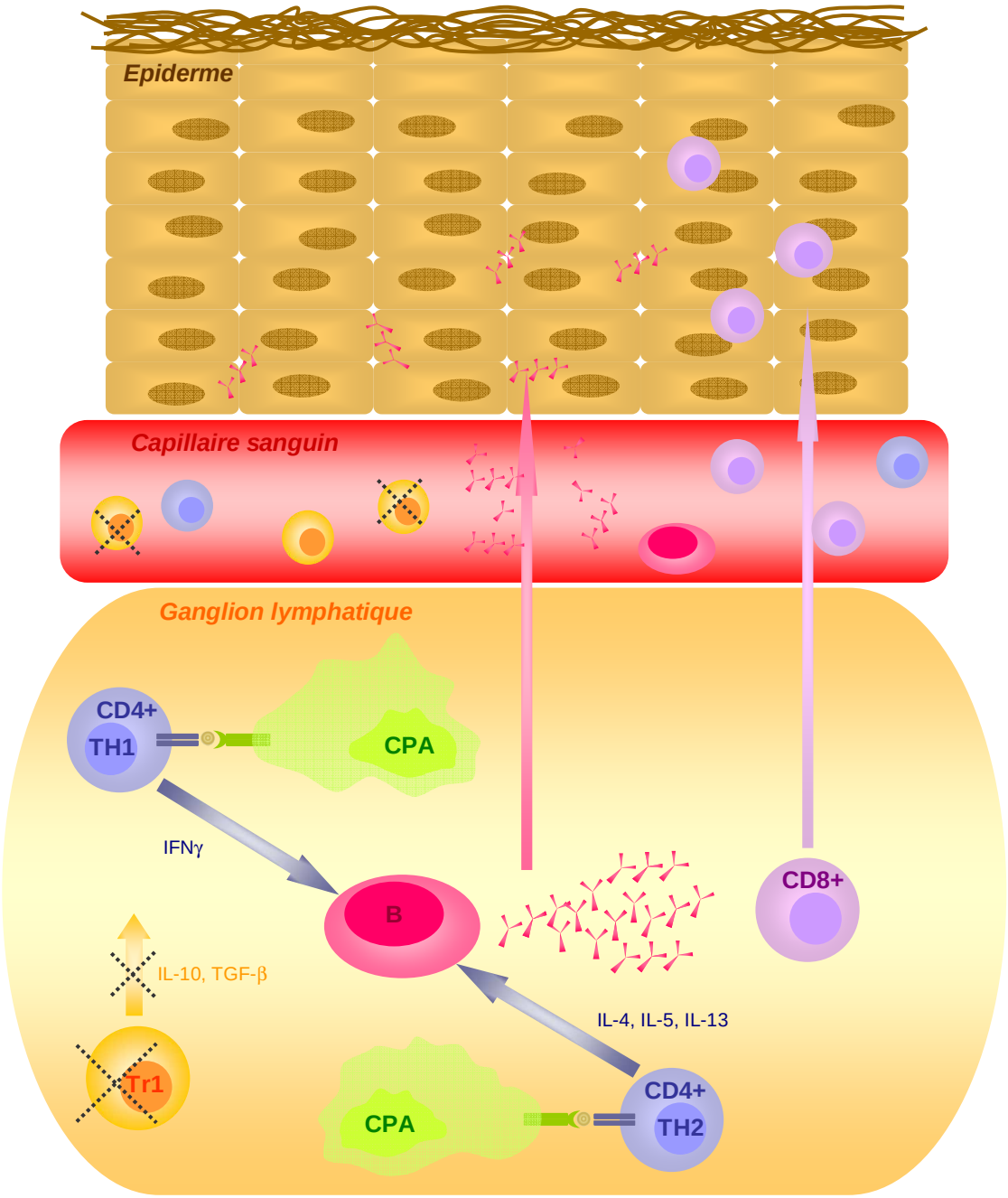


Figure 26. La réponse T au cours du pemphigus vulgaire. La production d'autoAc anti-Dsg par les cellules B autoréactives est probablement régulée par des lymphocytes T CD4+ de type Th1 et Th2 dirigés contre la Dsg1 et la Dsg3. Les cellules T autoréactives reconnaissent des peptides de la région extracellulaire de la Dsg3 présentées par les molécules HLA de classe II DRB1*0402 et DQB1*0503 portées par les CPA notamment, des cellules dendritiques et des cellules B. Des cellules T réagissant avec les mêmes épitopes de la Dsg3 sont présents chez les sujets sains porteurs des allèles de susceptibilité au PV mentionnés ci-dessus. Néanmoins, l'existence de cellules régulatrices de type Tr1, détectées plus fréquemment chez les individus sains comparés aux malades de PV, contrôlerait la réponse T anti-Dsg3. A l'instar, la diminution du nombre de cellules Tr1 chez les patients pourrait conduire à un défaut d'immunorégulation et donc à une rupture de la tolérance périphérique vis-à-vis de la Dsg3.

Pour ce qui est des PS, l'étude de la réponse T est plus modeste. Dans la forme endémique, des lymphocytes T proliférant vis à vis des domaines EC de la Dsg1 sont présents chez les malades et sécrètent des cytokines de type Th2 [Lin, 2000]. Les travaux de l'équipe de Hertl montrent que les lymphocytes T anti-Dsg1 de type Th2 et Th1 sont détectés à des fréquences similaires chez les patients atteints de PF et chez les sujets sains [Gebhard, 2005]. Aucune donnée de cartographie épitopique n'est actuellement disponible.

Des études de la réponse T ont été entreprises par l'analyse structurale des segments géniques codant pour la chaîne β des TCR exprimés par des clones T spécifiques de la Dsg3 ou de la Dsg1, générés à partir de cellules T autoréactives isolées de malades atteints de pemphigus. Au cours du *fogo selvagem*, l'analyse de la chaîne β du TCR de 17 clones T anti-Dsg1 montre une variabilité dans l'utilisation des différents segments géniques suggérant que la réponse lymphocytaire T dirigée contre la Dsg1 est de nature oligoclonale et donc, que l'induction et/ou la progression de la maladie n'est pas dépendante d'un seul type de TCR [Moestra, 2002]. Chez les malades atteints de PV, l'analyse du répertoire T autoréactif en fonction des épitopes reconnus, montre une corrélation entre l'utilisation préférentielle de certains segments Vβ et Vα du TCR exprimés par les clones T anti-Dsg3 et la spécificité des peptides reconnus sur la Dsg3 (Vα22Vβ13 pour l'épitope Dsg3 (145-192), Vα10Vβ7 pour l'épitope Dsg3 (240-303) et Vβ17 pour l'épitope Dsg3 (570-614)) [Hacker-Foegen, 2003].

Le rôle des populations de lymphocytes T régulateurs dans la survenue des pemphigus n'a été abordé que récemment. Veldman *et al* ont montré que des cellules T CD4+/CD45RO+, GITR+, TGF-βm+, spécifiques de la Dsg3 et sécrétrices d'IL10, sont isolées de sujets sains (porteurs des allèles HLA de susceptibilité au PV) mais sont plus rarement détectées chez les malades ($5,5/10^5$ PBMC *vs* $2,2/10^5$ PBMC). Ces cellules Tr1 stimulées par l'Ag sécrètent de l'IL10, du TGF-β et de l'IL5 et, prolifèrent en réponse à l'IL2 (mais pas en réponse à la Dsg3 ou à des *stimulus* mitogèniques). Elles sont capables d'inhiber la prolifération de clones T spécifiques de la Dsg3 ou de la toxine tétanique de manière Ag spécifique. Cette fonction immunosuppressive étant liée à la production d'IL10 et de TGF-β [Veldman, 2004a]. Les cellules Tr1 semblent en conséquence être impliquées de façon critique dans la maintenance et la restauration de la tolérance vis à vis de la Dsg3 puisque des lymphocytes T autoréactifs dirigés contre des peptides communs de la Dsg3 sont détectés à la fois chez les malades atteints de PV et chez les sujets sains porteurs des allèles de susceptibilité à la maladie. Ces cellules Tr1 spécifiques de la Dsg3 expriment constitutivement le facteur Foxp3 qui caractérise la population de lymphocytes T régulateurs CD4+ $CD25^{high}$. L'inhibition de l'expression de Foxp3 par un oligonucléotide antisens aboutit chez ces cellules Tr1 à : (i) une perte

d'expression des molécules GITR et CTLA-4; (ii) une sécrétion d'IL2; (iii) une réponse proliférative vis à vis de la Dsg3; (iv) une perte de leur activité suppressive sur des clones Th2 spécifiques de la Dsg3 [Veldman, 2006]. Ainsi, l'inhibition de l'expression des ARNm Foxp3 induit-elle une transition du phénotype Tr1 à celui de Th2. Le phénotype et la fonction des cellules Tr1 humaines sont donc directement liés à l'expression du facteur Foxp3.

Enfin, une étude récente montre que les cellules NK contribuent au biais de la réponse immune vers une réponse T de type TH2 chez les malades de PV par une altération de la voie de signalisation médiée par l'IL-12 et une expression cellulaire augmentée de l'IL10 et de l'IL5 [Takahashi, 2006].

A l'heure actuelle, aucune caractérisation précise de la réponse lymphocytaire T au cours du pemphigus à IgA et du PPN n'a été entreprise. Toutefois, certains arguments suggèrent que la réponse T dans le PPN pourrait être médiée par des cellules CD8+ [Hoffman, 2003].

VI. LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET EXOGENES DU PEMPHIGUS

A- L'épidémiologie des pemphigus endémiques

Les pemphigus endémiques partagent des caractéristiques cliniques, histologiques et immunologiques avec la forme sporadique de PS mais présentent des caractéristiques épidémiologiques très particulières et sévissent avec une prévalence augmentée dans certaines régions du monde plus particulièrement au Brésil, en Colombie et en Tunisie (Figure 27).

1/ LE FOGO SELVAGEM

Le pemphigus endémique a été décrit initialement par Paes-Leme en 1903 dans certaines régions du Brésil où il est connu depuis des siècles, sous le nom de *fogo selvagem* (« feu sauvage ») en référence à la symptomatologie fonctionnelle ressentie par les Indiens atteints par la maladie [Friedman, 1995]. Le *fogo selvagem* sévit en fait dans une zone plus vaste que le seul Brésil. Des foyers de la maladie sont connus dans plusieurs pays d'Amérique Centrale (Paraguay) et du Sud (Colombie, Argentine, Bolivie, Pérou, Salvador). Néanmoins, ce sont les études menées au Brésil notamment dans la région du Limao Verde (Figure 27*B*) qui ont permis de définir avec précision l'épidémiologie de la maladie. Tous les foyers décrits sont situés dans des régions partageant des caractéristiques géographiques précises ; elles sont situées entre le 40e et 60e degré de longitude, et le 5e et 25e degré de latitude entre 400 et 1000 m d'altitude, ce qui correspond aux zones subtropicales. La maladie survient essentiellement dans des zones rurales, touchant principalement des agriculteurs ayant un faible niveau de vie et

vivant à proximité de cours d'eau. L'incidence de la maladie s'accroît fortement pendant la période des pluies quand la densité d'insectes est la plus élevée, et varie fortement d'une année à l'autre [Hans-Filho, 1999]. Dans les zones d'endémie, la maladie touche à la fois les Amérindiens et des sujets d'origine non-indienne.

Figure 27. Les pemphigus endémiques. Trois types de pemphigus endémiques ont été individualisés (A) ; le pemphigus brésilien ou *fogo selvagem* qui sévit plus particulièrement dans la région du Limao Verde (B), le pemphigus colombien dans la région de El Bagre (C) et le pemphigus tunisien dans le sud de la Tunisie (D).

L'hypothèse d'un agent infectieux transmis par une mouche noire, la simulie, a été formulée mais reste à démontrer. En effet, la zone d'endémie correspond à l'habitat d'une mouche, la simulie (borrachudo ou *simulium pruinosum*). Une étude comparant la répartition des différentes espèces de simulie dans une région d'endémie par rapport aux régions voisines a par ailleurs montré une très nette prédominance de *simulium nigrimanum* dans la zone d'endémie, faisant de cet insecte un vecteur potentiel de la maladie. Récemment, une étude cas-témoins réalisée dans le Limao Verde a montré en outre que les habitats des malades hébergent plus fréquemment des ectoparasites de l'ordre des *Hemiptera* que sont les punaises (63% *vs* 32%) et les réduves (60% *vs* 29%) ainsi que certains rongeurs (13% *vs* 1%) [Aoki, 2004]. Il n'y a pas de transmission interhumaine de la maladie.

Si les facteurs d'environnement jouent un rôle important, le fond génétique intervient également. En effet de nombreux cas familiaux sont observés et une association forte entre la maladie et certains gènes HLA de classe II a été démontrée (cf. Génétique des pemphigus). De façon intéressante, les gènes de susceptibilité retrouvés chez les non-Amérindiens comme dans plusieurs tribus indiennes partagent une séquence commune sur une région du gène codant une partie de la molécule de classe II cruciale pour la présentation peptidique. Il apparaît donc clairement que le *fogo selvagem* fait intervenir des facteurs d'environnement qui ne peuvent induire la maladie que sur un terrain génétique de prédisposition. L'hypothèse d'une réaction immunitaire croisée entre un agent infectieux transmis par la simulie et les Ag kératinocytaires, ne pouvant se développer que chez les sujets porteurs des molécules HLA de classe II appropriées, est avancée et mérite d'être confortée [Hans-Filho, 1999]. A cet égard, Diaz *et al* ont récemment démontré la présence d'Ac anti-Dgs1 non pathogènes dans le sérum de patients atteints de maladies parasitaires et infectieuses résidant dans les mêmes régions brésiliennes que le *fogo selvagem* [Diaz, 2004]. Les prévalences les plus significatives ont été trouvées chez les malades atteints d'onchocercose (83%), de leishmaniose (43%) ou de maladie de Chagas (58%). Plus précisément, l'étude de la cartographie épitopique de la Dsg1 indique que les sérums de ces malades réagissent avec le domaine EC5 de la protéine. Les auteurs soulèvent l'hypothèse d'un mimétisme moléculaire entre un Ag contenu dans la salive des insectes hématophages porteurs des parasites à l'origine de l'onchocercose, de la leishmaniose et de la maladie de Chagas. En effet, la salive de vecteurs hématophages est une source d'Ag sensibilisants capables d'induire une production d'Ac chez l'homme [Barral, 2000]. Ainsi, l'immunisation avec un Ag environnemental aboutirait-elle à une réaction croisée avec le domaine EC5 de la Dsg1 et *ipso facto*, à une réponse autoAc anti-EC5 non pathogènes qui chez une minorité de

sujets, pourrait se diversifier par extension épitopique intramoléculaire jusqu'à une réponse pathogénique dirigée contre les domaines EC1 et EC2 de la Dsg1 [Li, 2003].

2/ LE PEMPHIGUS TUNISIEN

En Tunisie, le pemphigus présente des caractéristiques épidémiologiques particulières [Bastuji-Garin, 1995], le rapprochant à certains égards du pemphigus brésilien. Son incidence est plus élevée qu'en France (6,7 cas/an/million d'habitants *vs* 1,7 cas/an/million d'habitants) avec une prédominance des formes superficielles (61% des cas), faisant du pemphigus la maladie bulleuse la plus fréquente en Tunisie. Ce pemphigus touche plus les femmes avec un sexe *ratio* F/M de 4,1 (contre 1,2 en France). Alors qu'en France l'incidence de la maladie croît avec l'âge, en Tunisie l'incidence est plus élevée chez les femmes jeunes. Elle atteint 15,5 cas par an et par million d'habitants chez les femmes de 25-34 ans. La maladie est plus fréquente dans les zones rurales et chez les sujets vivant dans des conditions socio-économiques modestes. Aucun cas familial n'a été observé. Une étude cas-témoins récente portant sur 68 femmes atteintes de PS endémique tunisien et ayant pour but d'évaluer le rôle de facteurs environnementaux, a mis en évidence plusieurs facteurs de risque : la cosmétique traditionnelle, la fréquentation des hammams, le dépeçage de la volaille, le contact avec des ruminants et les piqûres de guêpes, abeilles et araignées [Bastuji-Garin, 2002]. Il existe donc des similitudes marquées entre le pemphigus endémique brésilien et le pemphigus tunisien puisqu'il s'agit dans les deux cas de PS touchant avec une incidence accrue des sujets jeunes vivant dans des conditions modestes en zone rurale. Cependant dans la forme tunisienne, il existe une prédominance féminine non observée dans la forme brésilienne. De plus les cas familiaux, fréquents au cours du pemphigus endémique brésilien, ne sont pas ou peu observés en Tunisie où la maladie touche exceptionnellement les enfants. Les facteurs étiologiques, qu'ils soient génétiques ou environnementaux, restent à préciser dans cette forme particulière de la maladie.

3/ LE PEMPHIGUS COLOMBIEN

Une forme endémique unique de PS sévissant dans le nord de la Colombie a été individualisée et possède des caractéristiques différentes de celles du *fogo selvagem* ou du pemphigus tunisien. Le pemphigus endémique colombien touche les zones rurales entourant la région *El Bagre* (Figure 27*C*). Les malades sont majoritairement des hommes (95,4%) dont 98% sont des mineurs, des agriculteurs ou des sylviculteurs ayant un bas niveau de vie. Plus de 40% d'entre eux présentent les caractéristiques cliniques et histologiques du pemphigus érythémateux (association pemphigus et lupus) affectant par ailleurs d'autres organes que la peau [Abreu-Velez, 2003b]. L'analyse de la réactivité des

autoAc montre une hétérogénéité similaire à celle observée au cours du PPN, mais sans association à une néoplasie [Abreu-Velez, 2003a]

B- Les facteurs exogènes

1/ LES PEMPHIGUS MEDICAMENTEUX

On distingue deux catégories distinctes de pemphigus médicamenteux : 1° les pemphigus auto-immuns déclenchés ou aggravés par une prise médicamenteuse. Ces cas se présentent et évoluent comme des pemphigus classiques, le médicament n'intervenant que dans le déclenchement du processus auto-immun sur un terrain génétiquement prédisposé [Mutasim, 1993] ; 2° les pemphigus induits, pour lesquels le médicament inducteur joue un rôle majeur dans la survenue de la maladie. Ces cas sont souvent de gravité modérée et régressent spontanément à l'arrêt du médicament inducteur. Les médicaments inducteurs de pemphigus médicamenteux peuvent être séparés en deux groupes comportant les médicaments thiolés d'une part, et non thiolés d'autre part [Anhalt, 1989]. La plupart des médicaments inducteurs comportent des groupements thiolés dans leur formule (pénicillamine, captopril, bucillamine, thiopronine) alors que d'autres doivent être métabolisés pour générer ces groupements thiol (pyritinol, sels d'or, pénicilline, céphalosporine, piroxicams). Cependant, certains médicaments (pyrazolone, énalapril) ne comportent aucun groupement soufré mais des groupements amides [Ruocco, 1993]. L'induction d'une acantholyse par les médicaments fait probablement intervenir à la fois un mécanisme biochimique et l'induction d'une réponse auto-immune, les deux mécanismes ne s'excluant pas mutuellement [Ruocco, 1993]. En effet, a été montré sur de la peau humaine en culture, que l'adjonction de médicaments inducteurs (comme la cantharidine) était capable d'induire une acantholyse. Cette action directement acantholytique permet d'expliquer les cas de pemphigus induit dans lesquels il n'est pas retrouvé d'Ac anti-épiderme. Différents mécanismes ont été évoqués. La fixation du médicament à la surface des kératinocytes pourrait interférer directement avec les fonctions d'adhésion des cadhérines desmosomales, activer *in situ* des enzymes protéolytiques ou inhiber des enzymes jouant un rôle dans l'adhésion interkératinocytaire. Cependant, la plupart des pemphigus médicamenteux sont auto-immuns et liés à la présence d'autoAc pathogènes.

2/ LES RADIATIONS, LES FACTEURS DE CONTACT, LES VIRUS ET LES ALIMENTS

De rares cas de pemphigus induits par des radiations ionisantes sont décrits dans la littérature [Delaporte, 1991]. Quelques observations pourraient indiquer un rôle possible des UV dans l'induction et l'aggravation des pemphigus [Reis, 2000 ; Sanchez-

Palacios, 2004]. De rares observations de pemphigus développés après dermatite de contact à différents produits chimiques ont été rapportées.

L'herpès simplex virus joue souvent le rôle d'infection opportuniste. Cependant, dans certains cas l'infection virale précède la survenue du pemphigus et certains auteurs évoquent donc un potentiel rôle inducteur. Une étude récente a montré la présence plus fréquente d'ADN de HHV-8 (*human herpesvirus-8*) dans la peau et dans les PBMC ainsi que d'IgG sériques spécifiques d'oligopeptides d'HHV-8 chez les malades atteints de pemphigus comparés à des individus sains [Wang, 2005]. Des cas de pemphigus faisant suite à une primo-infection à EBV et à CMV et survenant chez des patients VIH positifs ont été observés.

Certains aliments ont été incriminés dans l'induction, l'entretien ou l'aggravation de pemphigus en particulier, ceux renfermant des composés chimiques comportant des groupements thiols, isothiocyanates et phénols [Ruocco, 2001]. Ces groupements sont par exemple retrouvés dans les tannins, certaines épices et les plantes du groupe *allium* (oignon, ail, poireaux) au même titre que dans certains médicaments inducteurs (penicillamine, captopril) [Brenner, 1994]. Des études *in vitro* ont confirmés le pouvoir des allyls et des tannins qui sont en outre capables d'augmenter la prolifération et la cytotoxicité de lymphocytes T [Brenner, 1995 ; Brenner, 2000] Leur action pourrait donc passer à la fois par un mécanisme biochimique direct et par une action sur le système immunitaire, chez des sujets génétiquement prédisposés.

VII. LES TRAITEMENTS DES PEMPHIGUS

L'introduction des corticoïdes dans les années 50 a révolutionné le pronostic du pemphigus en faisant chuter la mortalité de 75 % à 30%. Ils constituent toujours le traitement le plus efficace et le seul capable d'induire, chez la plupart des patients, une rémission dans des délais acceptables [Lever, 1953]. Cependant, leur utilisation souvent prolongée et à fortes doses, est grevée d'une morbidité et d'une mortalité iatrogènes importantes et rend compte pour une part de la mortalité résiduelle de la maladie. C'est la raison pour laquelle d'autres thérapeutiques (immunosuppresseurs, Disulone, sels d'or, tétracyclines, plasmaphérèse…) ont été proposées avec pour double but de diminuer les doses de corticoïdes administrées et d'augmenter l'efficacité thérapeutique. Ces traitements sont parfois utilisés en monothérapie en remplacement des corticoïdes, dans les formes modérées ou en cas de contre-indication absolue des corticoïdes. Ailleurs, ils trouvent leur indication comme traitement adjuvant en cas de contre-indication relative des corticoïdes nécessitant une diminution des doses, en cas de réponse incomplète aux corticoïdes (corticorésistance), en cas de rechute au cours de la décroissance de la corticothérapie (corticodépendance), ou comme traitement d'entretien à l'arrêt des

corticoïdes. Leur utilisation systématique de première intention reste controversée car aucune étude randomisée n'a pu montrer un bénéfice réel lié à leur utilisation par rapport à une corticothérapie générale seule. Depuis leur utilisation, le taux moyen de rémission n'est d'ailleurs passé que de 28,9% dans les années 1950 chez des patients recevant une corticothérapie seule, à 20,5% ces dix dernières années. De plus, si la mortalité du pemphigus est passée au-dessous de 10%, il est difficile de déterminer la responsabilité relative des traitements adjuvants, de la meilleure prévention et de la meilleure prise en charge des effets secondaires de la corticothérapie, et du diagnostic plus précoce de la maladie [Bystryn, 1984].

Deux autres types de traitements pourraient s'avérer particulièrement prometteurs. Premièrement, plusieurs travaux ont démontré l'efficacité de l'administration d'immunoglobulines intraveineuses (IgIV) dans le traitement des pemphigus [Bystryn, 2005]. Bien que les mécanismes d'action soient complexes et non élucidés, le traitement par les Ig IV permet de diminuer très nettement, rapidement et sélectivement le titre des Ac du pemphigus dans le sérum des patients. Toutefois, les malades ne répondent pas de façon équivalente à ce traitement. Celui-ci combiné à des agents cytotoxiques capables de prévenir la synthèse *de novo* d'autoAc, pourrait être particulièrement efficace dans le contrôle de la maladie chez les patients non répondeurs aux thérapies conventionnelles. En second lieu, de nombreux cas reportés dans la littérature ont confirmé le bien fondé du traitement des pemphigus par immunothérapie anti-CD20 ou Rituximab. Le Rituximab (Mabthera®) est un Acm chimérique humanisé dirigé contre la molécule CD20 exprimée par les lymphocytes B et pré-B mais pas par les plasmocytes. Le Rituximab induit une destruction des populations lymphocytaires CD20+ qui s'est révélée très efficace dans le traitement de lymphomes non Hodgkiniens et de certaines MAI. Dans une étude prospective, nous avons traité 22 patients atteints de formes sévères de pemphigus par Rituximab (375 mg/m2/semaine) [Joly, manuscrit en préparation] et analysé les effets de cette immunothérapie sur les réponses immunes cellulaires et humorales au cours de la maladie [Musette, manuscrit en préparation]. Les résultats cliniques et immunologiques de cette étude sont présentés en annexe.

La recherche de nouveaux traitements (nouveaux immunosuppresseurs, immunothérapie spécifique) capables de se substituer aux corticoïdes et présentant des effets secondaires moins importants constitue un défi thérapeutique. Les connaissances acquises dans la physiopathologie du pemphigus (caractérisation de l'Ag, de la réponse B et de la réponse T, exploration des mécanismes pathogènes) laissent entrevoir des utilisations possibles d'une immunothérapie spécifique [Stanley, 2000]: destruction des cellules B autoréactives *in vivo* par des Ag recombinants couplés à des toxines cytotoxiques [Proby, 2000], immuno-adsortion spécifique des autoAc par affinité pour l'Ag

recombinant [Amagai, 1994 ; Amagai, 1995a], vaccination peptidique [Anhalt, 2001b], déviation de la réponse Th2 responsable de la production d'IgG4 par l'utilisation de cytokines Th1 ou simple inhibition de la prolifération T par l'IL-10, utilisation d'inhibiteurs de protéases. Une étude montre par ailleurs que des Ac anti-idotypes produits par immunisation de lapins avec les fragments F(ab')2 d'IgG de patients atteints de PF, inhibent la pathogénicité de ces IgG chez la souris BALB/c [Alvarado-Flores, 2001]. L'immunoadsorption *ex vivo* des Ac pathogènes à l'aide d'Ac anti-idiotype pourrait donc constituer une nouvelle voie thérapeutique. De plus, la découverte de molécules actives sur la maladie mais présentant moins d'effets secondaires que les corticoïdes permettrait de diminuer la mortalité encore liée essentiellement aux complications du traitement (intérêt potentiel du mycophénolate mofetil ou des nouveaux macrolides immunosuppresseurs du type tracrolimus, sirolimus ou ascomycine).

OBJECTIFS DE THESE

L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle de la Dsg1 dans la réponse auto-immune au cours des pemphigus. Depuis plus d'une décennie, le rôle de l'autoAg lui-même dans l'initiation, la propagation et la pérennisation de la réponse auto-immune a été conforté par de nombreux arguments expérimentaux. Dans notre équipe, le rôle de la Dsg1 au cours des pemphigus a été envisagé à la suite d'un ensemble de travaux démontrant notamment l'implication d'un polymorphisme du gène *DSG1* dans le déterminisme génétique du PF. Certaines des hypothèses à la base de ce travail de thèse ont été élaborées à partir d'observations fortuites faites au cours de l'étude et de la caractérisation de la réponse auto-immune anti-Dsg1 au cours de la maladie ou de l'analyse du gène *DSG1* à partir des transcrits.

Dans un premier temps, nous avons cherché à démontrer l'existence dans l'épiderme humain, d'une isoforme tronquée de la Dsg1 ainsi que son implication dans la réponse auto-immune au cours des pemphigus. Au préalable, nous avons confirmé l'existence, dans l'épiderme humain, des messagers alternatifs de la Dsg1 à l'origine de la production de cette isoforme, que nous avons mis en évidence lors du séquençage de l'ADNc codant pour la région EC de la Dsg1. Depuis une vingtaine d'années, la liste des autoAg subissant un épissage alternatif à l'origine de transcrits alternatifs/isoformes protéiques n'a cessé de s'allonger et, dans certains cas, ce mécanisme intervient à divers niveaux de la réponse auto-immune. Plus particulièrement, l'existence d'une réponse autoAc ou lymphocytaire T dirigée spécifiquement contre des isoformes d'autoAg, a été démontrée dans différentes MAI. A la lumière de ces travaux, nous avons recherché l'expression protéique de cette isoforme tronquée de la Dsg1 dans l'épiderme humain puis évalué la capacité de peptides spécifiques de cette protéine à se fixer aux molécules HLA de prédisposition au pemphigus et à induire la prolifération de PMBC isolées chez les malades.

Dans une seconde partie, mon travail a consisté en la caractérisation de la réponse Ac induite par l'immunisation de souris normales avec la région EC recombinante de la Dsg1. Certains de ces animaux développent, à côté de la réponse IgG anti-Dsg1, des Ac dirigés contre d'autres protéines épidermiques. Cinq Acm représentatifs des différentes spécificités détectées dans les sérums de ces souris ont été produits. Deux de ces Acm ne réagissent pas avec la Dsg1 mais reconnaissent des protéines de plus haut poids moléculaire. Nous avons cherché à les identifier afin de comprendre ce phénomène de diversification de la réponse Ac. Dans cette optique, nous avons choisi comme stratégie d'identification, l'immunocriblage de carte protéique 2D d'épiderme humain. Cette approche a nécessité la réalisation d'une carte 2D des protéines épidermiques de haut poids moléculaire et par conséquent, une

adaptation du procédé technique d'électrophorèse bidimensionnelle à cette problématique.

Enfin, de nombreux transcrits codant pour des Ag tissus-spécifiques notamment des autoAg cibles au cours de certaines MAI sont exprimés dans le thymus humain, en particulier par les CPA thymiques. Ainsi, la présentation de peptides autoantigèniques aux thymocytes en cours de maturation participe-t-elle à l'aquisition de la tolérance immune *via* la sélection négative de cellules T autoréactives ou la sélection positive de lymphocytes T régulateurs. Afin de mieux comprendre les mécanismes de tolérance vis-à-vis de la Dsg1, nous avons étudié son expression dans le thymus humain à partir de fragments thymiques provenant de sujets sains. La signification des résultats observés sera discutée.

MATERIELS

&

METHODES

MATERIELS & METHODES

A- Les patients

1/ DIAGNOSTIC

Vingt et un patients présentant un PF (n=8) et un PV (n=13), de même que 6 malades atteints de pemphigoïde bulleuse vus dans les services de dermatologie du « groupe français d'étude sur les bulles » ont été inclus dans notre étude. Les patients ont donné leur consentement pour participer à cette étude. Le diagnostic clinique de la maladie a été confirmé par : (i) analyse histologique, (ii) IFD sur biopsie de peau périlésionnelle, (iii) l'analyse des sérums par IFI sur coupes d'œsophage de singe (The Binding Site, Birmingham, UK) ou de peau humaine clivée au NaCl 1 M, par immunoempreinte sur un extrait d'épiderme humain et par ELISA (MBL, Nagano, Japon) pour détecter des IgG anti-Dsg1/3 chez les patients atteints de pemphigus et des IgG anti-BP180 chez les malades atteints de pemphigoïde bulleuse. Les malades atteints de pemphigus sont classés en 3 groupes selon leur statut clinique (3 phases de la maladie) : (i) la phase active définie comme le développement *de novo*, d'érosions/bulles cutanées et/ou muqueuses chez les malades non traités, (ii) la phase chronique définie comme une rémission incomplète ou une rechute chez les patients présentant un traitement immunossupresseur, (iii) la rémission clinique définie comme l'absence de (nouvelles) lésions depuis 6 mois chez les patients traités.

2/ LE GENOTYPAGE HLA DE CLASSE II

L'ADN génomique est extrait à partir de 2 ml de sang prélevé sur des tubes héparinés chez les malades atteints de pemphigus à l'aide du kit QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA) et utilisé pour le génotypage HLA DRB1 comme précédemment décrit [Martel, 2000].

B- La quantification des transcrits normaux et alternatifs de la desmogléine 1 dans l'épiderme humain

1/ SOURCE TISSULAIRE

Les fragments d'épiderme humain ont été obtenus à partir de pièces de résection chirurgicale issues de plasties mammaires, pratiquées chez des sujets normaux (Clinique Saint-Antoine, Bois-Guillaume, France). L'épiderme est séparé du derme au scalpel et plongé immédiatement dans l'azote liquide. Les différents prélèvements qui nous ont été fournis, désignés HE (*Human Epidermis*) suivi d'un numéro, sont utilisés comme source d'ARN totaux d'épiderme humain et comme substrat tissulaire pour la préparation d'extrait protéique.

Les fragments de thymus humain ont été prélevés chez des sujets subissant une thymectomie pour une pathologie cardiovasculaire (CHU Charles Nicolle, Rouen; Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson).

2/ EXTRACTION DES ARN ET TRANSCRIPTION INVERSE

Les fragments d'épiderme humain (100 mg) et de thymus humain sont tout d'abord broyés dans l'azote liquide pour être réduits en poudre. Les ARN totaux sont ensuite extraits à l'aide du réactif TRIzol™ (Life Technologies, Eragny, France) selon les instructions du fournisseur. Après extraction, la présence et la qualité des ARN sont vérifiées après migration électrophorètique (8V/cm) sur un gel d'agarose à 1 % dans du tampon de migration TAE (0,04 M Tris Acétate, 1mM EDTA. Les bandes d'ARN (28S, 18S et 5S) sont ensuite révélées sous les UV après immersion du gel dans une solution de TAE contenant du Bromure d'éthidium (BET) (1 µg/ml) durant 30 min. La quantification de ces ARN est ensuite réalisée par mesure spectrophotométrique à 260 nm. La transcription inverse des ARN messagers (ARNm) en ADN complémentaires (ADNc) est réalisée en utilisant des hexamères présentant toutes les combinaisons possibles des 4 nucléotides qui vont s'hybrider sur les ARN, permettant ainsi d'initier la synthèse d'ADNc par la *Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Life Technologies). Un tube contenant 5 µg d'ARN, complété à 22 µl avec de l'eau, est incubé à 66 °C pendant 5 min afin de détruire les structures secondaires de l'ARN puis placé 5 min sur la glace. Le mélange composé de : 2 µl d'hexamères aléatoires pdN6 à 100 pmol/µl (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 2 µl de dNTP (25 mM chacun) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 8 µl du tampon de la transcriptase inverse (Invitrogen), 1 µl de RNAsin (40 U/ µl) (Invitrogen), 4 µl de dithiotréitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen) et 1 µl de M-MLV RT (200 U/µl) (Invitrogen), est ensuite ajouté au tube contenant les ARN qui est alors placé à 37 °C pendant 1 h. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation à 95 °C pendant 5 min.

3/ AMPLIFICATION DES SEQUENCES ADNc SPECIFIQUES DES TRANSCRIPTS NORMAUX ET ALTERNATIFS DE LA DESMOGLEINE 1

Une amplification préalable par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) d'une séquence de 549 pb présente sur les ADNc spécifiques des ARNm de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), gène « domestique » ayant une répartition *a priori* ubiquitaire et constante dans un tissu donné, est réalisée afin de contrôler la synthèse des ADNc par la transcription inverse. Afin de mettre en évidence leur existence dans la peau humaine de sujets sains, des amplifications par PCR de séquences d'ADNc spécifiques des transcrits normaux (*DSG1*) et alternatifs (*DSG1*-AT) de la Dsg1 sont réalisées. Ces réactions de PCR sont réalisées à l'aide de couple d'amorces

spécifiques de chaque produit (Figure 28, Tableau 16), dans les milieux réactionnels et les conditions qui sont détaillés dans les tableaux 17 et 18. Les produits d'amplification mélangés à une solution de dépôt sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 1 % pour subir une séparation électrophorètique. La taille des bandes d'ADN révélées sous les UV est vérifiée par comparaison avec la migration du marqueur de taille GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Vilnius, Lituanie).

```
S
 M   D   W   S   F   F   R   V   V   A   V   L   F   I   F   L   V   V    18
ATG GAC TGG AGT TTC TTC AGA GTA GTT GCA GTG CTG TTC ATT TTT CTG GTG GTG   54
Exon 1                                                          Exon 2
                P
 V   E   V   N   S   E   F   R   I   Q   V   R   D   Y   N   T   K   N    36
GTA GAA GTT AAC AGT GAA TTC CGA ATC CAG GTA AGA GAT TAT AAC ACT AAA AAT  108
                                        Exon 3
                                                EC1
 G   T   I   K   W   H   S   I   R   R   Q   K   R   E   W   I   K   F    54
GGC ACC ATC AAA TGG CAT TCA ATC CGA AGG CAG AAA CGT GAA TGG ATC AAG TTC  162

 A   A   A   C   R   E   G   E   D   N   S   K   R   N   P   I   A   K    72
GCA GCA GCC TGT CGT GAA GGT GAA GAC AAC TCA AAG AGG AAC CCA ATC GCC AAA  216

 I   H   S   D   C   A   A   N   Q   Q   V   T   Y   R   I   S   G   V    90
ATT CAC TCA GAT TGT GCT GCA AAC CAG CAA GTT ACA TAC CGC ATC TCT GGA GTA  270
Exon 4
 G   I   D   Q   P   P   Y   G   I   F   V   I   N   Q   K   T   G   E   108
GGA ATT GAT CAG CCA CCA TAT GGG ATC TTT GTC ATT AAT CAG AAA ACT GGT GAA  324

 I   N   I   T   S   I   V   D   R   E   V   T   P   F   F   I   I   Y   126
ATT AAT ATA ACA TCC ATA GTT GAT CGA GAG GTC ACT CCT TTC TTC ATT ATC TAC  378
                                                                Exon 5
 C   R   A   L   N   S   M   G   Q   D   L   E   R   P   L   E   L   R   144
TGC CGA GCT CTG AAC TCA ATG GGC CAA GAT TTA GAG AGG CCT CTA GAG CTC AGA  432
                                                EC2
 V   R   V   L   D   I   N   D   N   P   P   V   F   S   M   A   T   F   162
GTC AGG GTT TTG GAT ATA AAT GAC AAC CCT CCA GTG TTT TCA ATG GCT ACA TTT  486
                                                    DSG1 sens
 A   G   Q   I   E   E   N   S   N   A   N   T   L   V   M   I   L   N   180
GCA GGA CAA ATA GAA GAA AAT TCT AAT GCA AAT ACA CTG GTG ATG ATA CTC AAT  540
                                        Exon 6
 A   T   D   A   D   E   P   N   N   L   N   S   K   I   A   F   K   I   198
GCT ACT GAC GCA GAT GAA CCG AAC AAT TTG AAC TCA AAA ATA GCC TTC AAG ATT  594

 I   R   Q   E   P   S   D   S   P   M   F   I   I   N   R   N   T   G   216
ATA AGA CAA GAA CCT TCA GAT TCA CCA ATG TTT ATT ATC AAC AGA AAT ACT GGA  648
                                                INT6
 E   I   R   T   M   N   N   F   L   D   R   E   I   Y   V   N   V   E   234
GAA ATT CGA ACG ATG AAT AAT TTT CTA GAC AGA GAG ATT TAT GTA AAC GTT GAG  702
                                    DSG1-AT sens    Insertion Intron 6
 P   T   F   Q   R   T   L   H   K   T   K   *                           245
CCA ACT TTT CAA AGA ACT TTA CAT AAG ACA AAG TAA AGG CTG TCT ACG TCA AGT  756
                                            Codon Stop
GTG ATA TTG CCT GTA ATA TGT ATT TTT AGC AAT ACG GCC AGT ATG CTC TTG CTG  810
DSG1-AT antisens                        Exon 7
TAA GAG GCT CTG ACC GAG ATG GCG GGG CAG ATG GCA TGT CAG CGG AAT GTG AGT  864
DSG1 antisens
GCA ACA TTA AAA TCC TCG ATG TCA ATG ATA ATA TCC CTT ACA TGG AAC AGT CTT  918

CAT ATA CC  926
Exon 8
```

Figure 28. Séquences nucléique et protéique de l'isoforme tronquée de la desmogléine 1. La figure montre la séquence ADNc spécifique du transcrits alternatif codant pour l'isoforme tronquée de la Dsg1. Cette isoforme est composée dans l'orientation N- à C-terminale, des séquences signal et propeptide, du domaine EC1, de la région 157–227 du domaine EC2 et d'un peptide de 17 aminoacides, nommé INT6 (surligné en noir), à l'extrémité C-terminal. Ce peptide INT6 est codé par l'extrémité 3´ d'une insertion intronique correspondant à une séquence de 101 pb de l'intron 6 du gène *DSG1* (surligné en gris). Les amorces *DSG1* sens et antisens sont utilisées pour amplifier les ADNc spécifiques des ARNm normaux de la Dsg1 et les amorces *DSG1*-AT sens et antisens, ceux spécifiques des transcrits alternatifs de la Dsg1.

Tableau 16. Séquences des amorces utilisées pour la l'amplification des séquences ADNc spécifiques des transcrits *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT

Gène amplifié	Amorce sens	Amorce antisens	Taille (pb)
GAPDH	5´-TGC CAT CAA CGA CCC CTT CA-3´	5´-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3´	549
DSG1	5´-AAT GGC TAC ATT TGC AGG ACA-3´	5´-ATC TCG GTC AGA GCC TCT TAC A-3´	256
DSG1-AT	5´-TAG ACA GAG AGA TTT ATG TAA AVG TTG-3´	5´-TAT TAC AGG CAA TAT CAC ACT TGA C-3´	101

Tableau 17. Composition du mélange réactionnel de PCR pour l'amplification des séquences ADNc spécifiques des transcrits *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1-AT*

Réactifs	Volumes
Matrice (ADNc)	5 µl
Mélange des 4 dNTPs (12,5 mM chacun) (Promega)	1 µl
Tampon de la *Taq*DNA Polymérase (10X) (Promega)	5 µl
$MgCl_2$ 25 mM (Promega)	3 µl
Amorce sens (100 pmol/µl) + amorce antisens (100 pmol/µl)	0,25 µl + 0,25 µl
*Taq*DNA Polymérase 5 U/µl (Promega)	0,5 µl
H_2O	q.s.p. 50 µl

Tableau 18. Phases de la réaction de PCR classique pour l'amplification des séquences ADNc spécifiques des transcrits *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	3 min	94 °C	1
Dénaturation	1 min	94 °C	
Hybridation	30 sec	58 °C à 60 °C*	35 à 40
Elongation	30 sec	72 °C	
Elongation finale	5 min	72 °C	1

* : la température d'hybridation est 58°C pour les PCR GAPDH et DSG1-AT, et de 60°C pour la PCR DSG1.

4/ QUANTIFICATION DES TRANSCRITS NORMAUX ET ALTERNATIFS DE LA DESMOGLEINE 1 PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Principe de la PCR en temps réel sur l'appareil LightCycler™ (Figure 29)

Le principe de base de la PCR quantitative (Q-PCR) en temps réel est la mesure récurrente d'un signal fluorescent, qui est proportionnel à la quantité de produit amplifié, avec pour objectif de mesurer l'accumulation des produits d'amplification au cours de la réaction et de déterminer la quantité initiale de matrice dans le milieu réactionnel. Le LightCycler™ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Allemagne) est un appareil automatisé de quantification en temps réel par fluorimétrie de produits de PCR. Il est composé d'un thermocycleur à air pulsé permettant des variations thermiques extrêmement rapides et d'un micro-spectrofluorimètre pour la détection de la fluorescence. Cet appareil est relié à un ordinateur qui permet l'acquisition des données en temps réel et le paramétrage *via* une interface graphique. C'est la mesure de la fluorescence émise par le SYBR™ Green, agent intercalant et fluorescent, qui permet de quantifier les produits synthétisés à chaque cycle. Avec l'appareil LightCycler™, la mesure de la quantité de matrice présente initialement dans l'échantillon est réalisée par comparaison du point de croisement ou *crossing point* (Cp) de la courbe d'amplification du gène étudié par rapport à celui obtenu par l'amplification d'un ADN contrôle standard, constitué soit d'un plasmide soit de produits de PCR purifiés de concentration connue. Le Cp représente le nombre de cycles pour lequel la courbe d'amplification coupe une ligne de base correspondant au seuil de détection de la fluorescence, seuil au-dessous duquel toute fluorescence est considérée comme du bruit de fond. A chaque cycle de la réaction de PCR, les capillaires en verre (fermés par un bouchon) sont placés devant une diode émettant à 470 nm. Le SYBR™ Green titré dans le milieu réactionnel devient fluorescent et réémet une fluorescence à 530 nm dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration d'ADN. Il est nécessaire de préciser que ce n'est qu'une fois lié à l'ADN double brin qu'il peut émettre le signal fluorescent, détectée par le micro-spectrofluorimètre.

Le SYBR™ Green est un agent intercalant qui s'incorpore à toutes les molécules d'acide nucléique double brin. Comme il est non spécifique de séquence, des détections d'amplifications non spécifiques ou de formation de dimères d'amorces peuvent venir altérer l'interprétation des résultats. Pour pallier à ce problème, l'établissement d'une courbe de fusion, à la fin de la réaction de PCR, permet de détecter la présence d'un ou de plusieurs produits d'amplification. Cette étape consiste en une dénaturation des amplicons à 94°C pour obtenir des molécules d'ADN simple brin, qui sont ensuite réappariées à la température d'hybridation des amorces

augmentée de 5°C. Une augmentation lente (0,1°C par seconde) jusqu'à 94°C permet un désappariement progressif et lent des molécules ADN et donc une diminution lente de la fluorescence émise. Lorsque la température de fusion (Tm) du produit amplifié est atteinte, 50 % de la quantité totale de ce produit sont simple brin, entraînant une diminution visible à l'écran de la fluorescence. Le calcul effectué par le logiciel du LightCycler™ de la dérivée première de la fluorescence sur la température (-dF/dT) permet d'obtenir une courbe qui donne un pic à la Tm du produit amplifié. La courbe de fusion permet donc de différencier les produits spécifiques des produits non spécifiques et de constater la présence de contaminants ou la formation de dimères d'amorces.

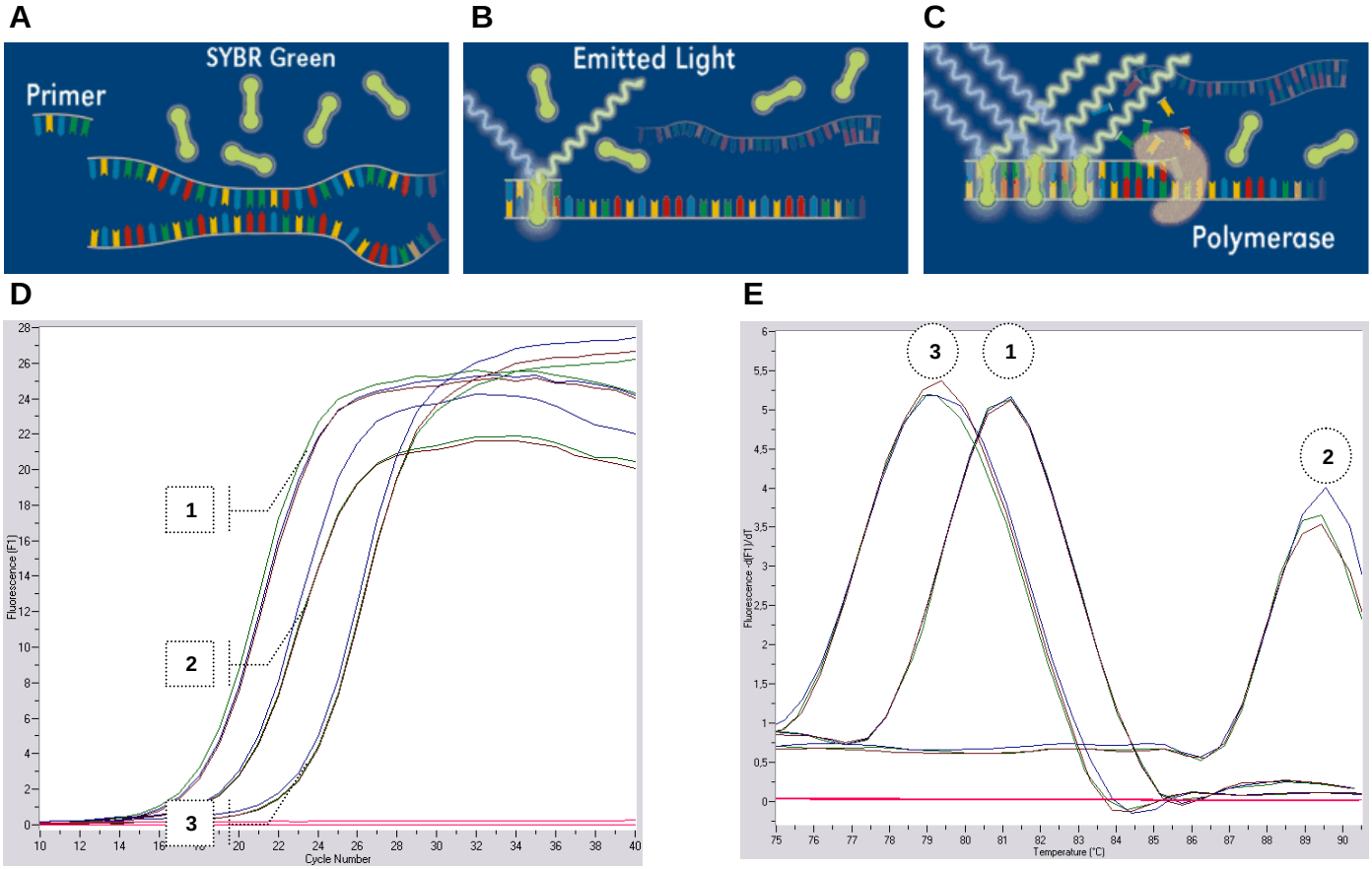


Figure 29. Principe de la PCR en temps réel sur l'appareil LightCycler. Le principe de base de la PCR quantitative (Q-PCR) en temps réel est la mesure récurrente d'un signal fluorescent, qui est proportionnel à la quantité de produit amplifié, avec pour objectif de mesurer l'accumulation des produits d'amplification au cours de la réaction et de déterminer la quantité initiale de matrice dans le milieu réactionnel. C'est la mesure de la fluorescence émise par le SYBR™ Green, agent intercalent et fluorescent, qui permet de quantifier les produits synthétisés à chaque cycle. La PCR se déroule en 3 phases : La dénaturation (A) ; l'ADN dénaturé est sous forme simple brin, le SYBR™ Green est libre dans le capillaire et aucune fluorescence n'est émise. L'hybridation (B) ; les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires sur l'ADN, le SYBR™ Green commence à s'intercaler et une émission de fluorescence apparaît. L'élongation (C) ; Le SYBR™ Green s'incorpore en grande quantité et l'émission de la fluorescence augmente. A la fin de la phase d'élongation, la totalité de l'ADN est double brin, la fluorescence observée est maximale (plateau). Les courbes d'amplification permettent de suivre l'intensité de la fluorescence émisse en fonction du nombre de cycle de la réaction de PCR par exemple, de 3 ADNc différents (C). La spécificité des produits d'amplification est contrôlée par l'établissement d'une courbe de fusion à la fin de la PCR (D).

Amplification des séquences ADNc d'intérêt par Q-PCR en temps réel

Les réactions de Q-PCR quantitative en temps réel utilisant le SYBR™ Green sont réalisées à l'aide du kit Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals). La composition du milieu réactionnel de PCR (pour chaque capillaire) est détaillée dans le tableau 19. Les capillaires sont ensuite centrifugés et placés dans l'appareil LightCycler™. Celui-ci est alors programmé *via* son interface graphique pour les différentes phases de la réaction selon le programme décrit dans le tableau 20. Après une étape finale de refroidissement (destinée à éviter que le bloc chauffant ne s'endommage), le logiciel d'analyse des données permet l'accès à l'ensemble des résultats de l'expérience (courbes d'amplification, courbes de fusion…).

Tableau 19. Composition du milieu réactionnel des réactions de Q-PCR en temps réel sur LightCycler™ pour l'amplification des ADNc *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT.

Réactifs	Volumes
$MgCl_2$ 25 mM (Roche Molecular Biochemicals)	1,6 µl
Amorce sens (10 pmol/µl)	1 µl
Amorce antisens (10 pmol/µl)	1 µl
Fast Start Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals)*	2 µl
H_2O (Roche Molecular Biochemicals)	q.s.p. 18 µl
ADNc ou matrice servant de contrôle externe	2 µl

* : Ce réactif est constitué de l'enzyme FastStart (Taq polymérase Hot Start) auquel est ajouté un mélange contenant le SYBR Green I, les dNTPs, le tampon de PCR et 1 mM de MgCl2.

Tableau 20. Phases de la réaction de Q-PCR en temps réel sur LightCycler™ pour l'amplification des ADNc *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT.

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	10 min	94 °C	1
Phases d'amplification			
Dénaturation	20 sec	94 °C	
Hybridation	10 sec	61 ou 62 °C*	40
Elongation	12 ou 22 sec*	72 °C	
Phases de « fusion »			**Rapports de montée en température**
Dénaturation	10 sec	94 °C	20°C/sec
Réappariement	30 sec	66 ou 67°C**	20°C/sec
Montée en température		94 °C	0,1°C/sec
Refroidissement de l'appareil	1 min	40 °C	

* : La température d'hybridation de 61°C et la durée d'élongation de 12 sec pour l'amplification des ADNc *DSG1* (transcrits normaux et alternatifs) sont remplacés par une température de 62°C et une durée de 22 sec pour l'amplification des ADNc *GAPDH* ; ** : correspond à la température d'hybridation + 5°C.

Normalisation et quantification des transcrits normaux et alternatifs de la desmogléine 1

Pour déterminer le nombre absolu de copies des transcrits étudiés, des produits de PCR spécifiques de chaque type de transcrits (*GAPDH*, *DSG1* et transcrits alternatifs de la Dsg1 : *DSG1*-AT) sont utilisés pour générer des courbes standard de calibration, basées sur des dilutions en série. Ces produits sont obtenus par PCR classique puis purifiés après migration sur un gel d'agarose à 1 % avec le kit Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen). La quantification est réalisée après séparation électrophorètique, par comparaison de l'intensité des bandes d'ADN visualisées sous les UV à celles du marqueur de concentration Mass Ruler DNA Ladder (MBI Fermentas) ainsi que par mesure spectrophotométrique à 260 nm.

La conversion des µg en nombre de copies (n) est donnée par la formule suivante : n = [(m x 1515)/Nbp] x 10-12 x N (m, masse en µg de matrice utilisée pour l'amplification ; Nbp, nombre de paires de bases du fragment amplifié ; N, constante d'Avogadro = $6{,}022e^{23}$ molécules/mole) [Vandenbroucke, 2001 ; Karsai, 2002]. La courbe de calibration représente le Cp en fonction du nombre de copies pour chaque point de dilution. Les gammes sont constituées de 5 points avec un facteur de dilution égal à 10.

Ces gammes servent aussi à calculer l'efficacité de la PCR. En effet, une PCR est considérée comme quantitative quand elle est efficace, c'est-à-dire quand son efficacité (e) est proche de 100 %, cas idéal où, à chaque cycle, la quantité d'ADN amplifié est doublée. Dans la plupart des cas, l'efficacité est comprise entre 80 et 90 % dans les premiers cycles d'amplification. Pour vérifier l'efficacité d'une PCR donnée et valider les conditions d'amplification, il convient de réaliser une amplification à partir d'une gamme de dilution de matrice, afin de tracer la droite de régression de cette gamme et d'en déterminer la pente (p). La valeur de p obtenue permet de calculer l'efficacité de chacune des PCR mises au point. En effet, au cours de la phase exponentielle de la PCR, l'efficacité est donnée par la formule : $e = 10^{-1/p}$. Lorsque la valeur de p = -3,32 l'efficacité de PCR est de 2, soit de 100 %.

Le logiciel calcule également le taux d'erreur : pour une gamme de dilution de 4 points, il doit être inférieur à 0,1 et pour une gamme de dilution de 5 points, inférieur à 0,2. Le nombre de copies des ADNc spécifiques des transcrits *GAPDH*, *DSG1* et *DSG1*-AT pour chaque échantillon testé est déterminé par le logiciel du LightCycler™ à partir des courbes de calibration correspondante. Au cours d'une même expérience et pour chaque échantillon, les ADNc des différents transcrits étudiés sont quantifiés (en triplicate) en même temps que les dilutions en série de produits de PCR correspondants (en triplicate). Pour corriger les variations inter-essais dûes à la qualité de l'ARN et à l'efficacité de la transcription inverse entre les échantillons, les données obtenues pour les deux types de transcrits *DSG1* sont normalisées en divisant le nombre de copies de l'ADNc cible par celui du gène domestique utilisé en l'occurrence, *GAPDH* [Raaijmakers, 2002]. Les résultats quantitatifs (quantité absolue) sont présentés comme un nombre de copies du transcrit cible (*DSG1* et *DSG1*-AT) pour 1000 copies de *GAPDH* [Wellmann, 2001 ; Marcucci, 2001]. La quantité relative des transcrits alternatifs *DSG1* est évaluée dans les 9 échantillons (en pourcentage), en réalisant le rapport entre le nombre de copies d'ADNc *DSG1*-AT et le nombre total de copies d'ADNc spécifiques des 2 types de transcrits *DSG1* soit la formule suivante : [n*DSG1*-AT/(n*DSG1*-AT + n*DSG1*)] x 100.

C- Production des desmogléines 1 recombinantes

1/ PRODUCTION DE LA PROTEINE REC1/5-DSG1

La région EC complète de la Dsg1 est produite sous forme d'une protéine recombinante fusionnée à l'extrémité C-terminale, à 2 séquences peptidiques, le peptide FLAG et un peptide composé de 6 résidus histidine. La production de cette protéine recombinante, nommée rEC1/5-Dsg1, est réalisée dans le système baculovirus/cellules d'insectes. Ce système possède deux avantages principaux pour la synthèse d'Ag recombinants, il permet une production en masse de la baculoprotéine et la réalisation par la machinerie cellulaire des cellules d'insectes, de nombreuses modifications post-traductionnelles qui peuvent participer aux propriétés immunogèniques de la protéine. La synthèse de la baculoprotéine se déroule en deux étapes principales : 1° Une étape de génétique moléculaire qui consiste en la fabrication d'un virus recombinant (Figure 30) ; 2° Une étape de biologie cellulaire qui consiste en la culture des cellules d'insectes infectées par le virus recombinant qui produisent la protéine recombinante (Figure 31)

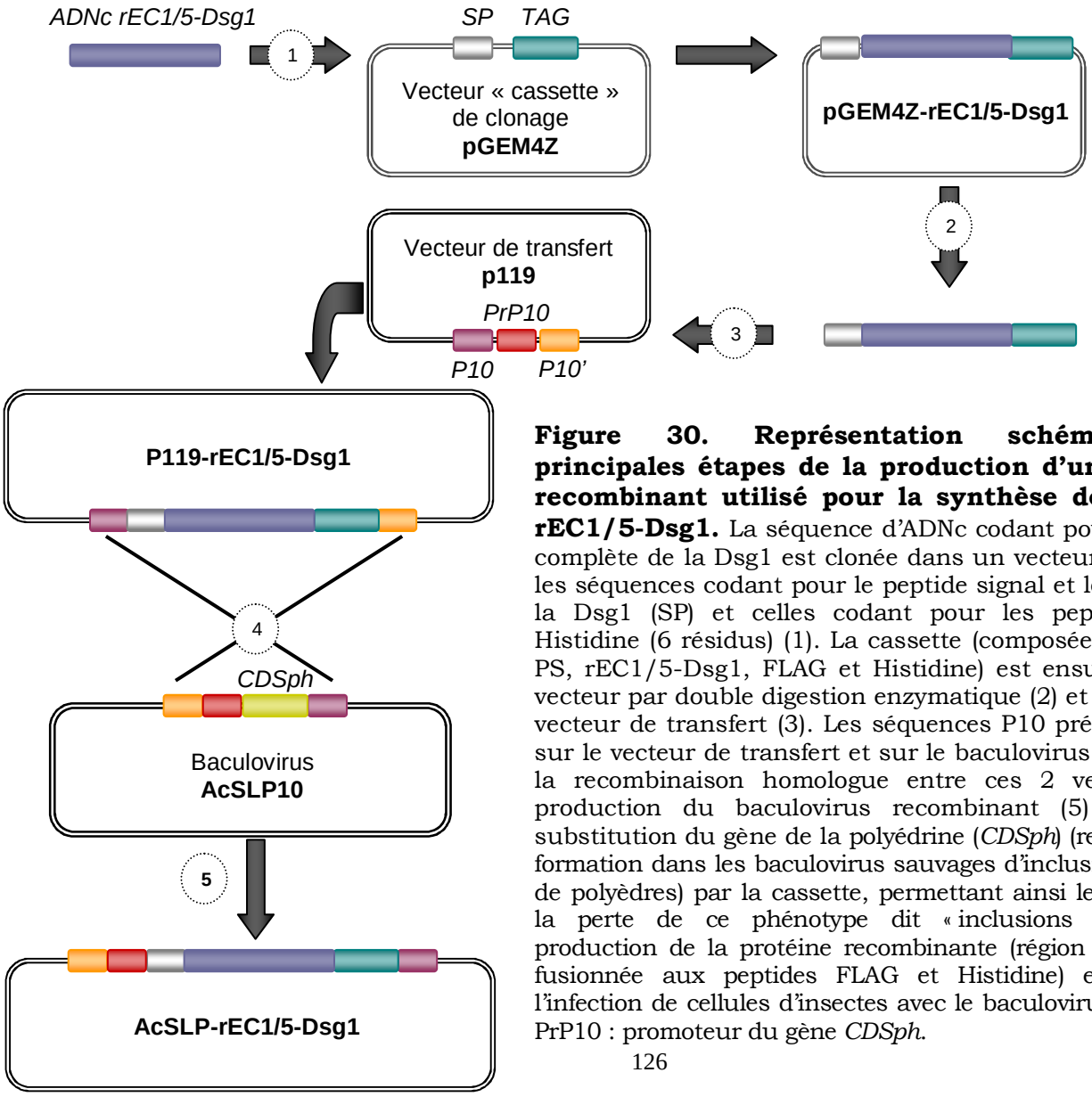


Figure 30. Représentation schématique des principales étapes de la production d'un baculovirus recombinant utilisé pour la synthèse de la protéine rEC1/5-Dsg1. La séquence d'ADNc codant pour la région EC complète de la Dsg1 est clonée dans un vecteur cassette entre les séquences codant pour le peptide signal et le propeptide de la Dsg1 (SP) et celles codant pour les peptides FLAG et Histidine (6 résidus) (1). La cassette (composée des séquences PS, rEC1/5-Dsg1, FLAG et Histidine) est ensuite extraite du vecteur par double digestion enzymatique (2) et insérée dans le vecteur de transfert (3). Les séquences P10 présentes à la fois sur le vecteur de transfert et sur le baculovirus vont permettre la recombinaison homologue entre ces 2 vecteurs (4). La production du baculovirus recombinant (5) aboutit à la substitution du gène de la polyédrine (*CDSph*) (responsable de la formation dans les baculovirus sauvages d'inclusions sous forme de polyèdres) par la cassette, permettant ainsi leur sélection *via* la perte de ce phénotype dit « inclusions négatives ». La production de la protéine recombinante (région EC de la Dsg1 fusionnée aux peptides FLAG et Histidine) est réalisée *via* l'infection de cellules d'insectes avec le baculovirus recombinant. PrP10 : promoteur du gène *CDSph*.

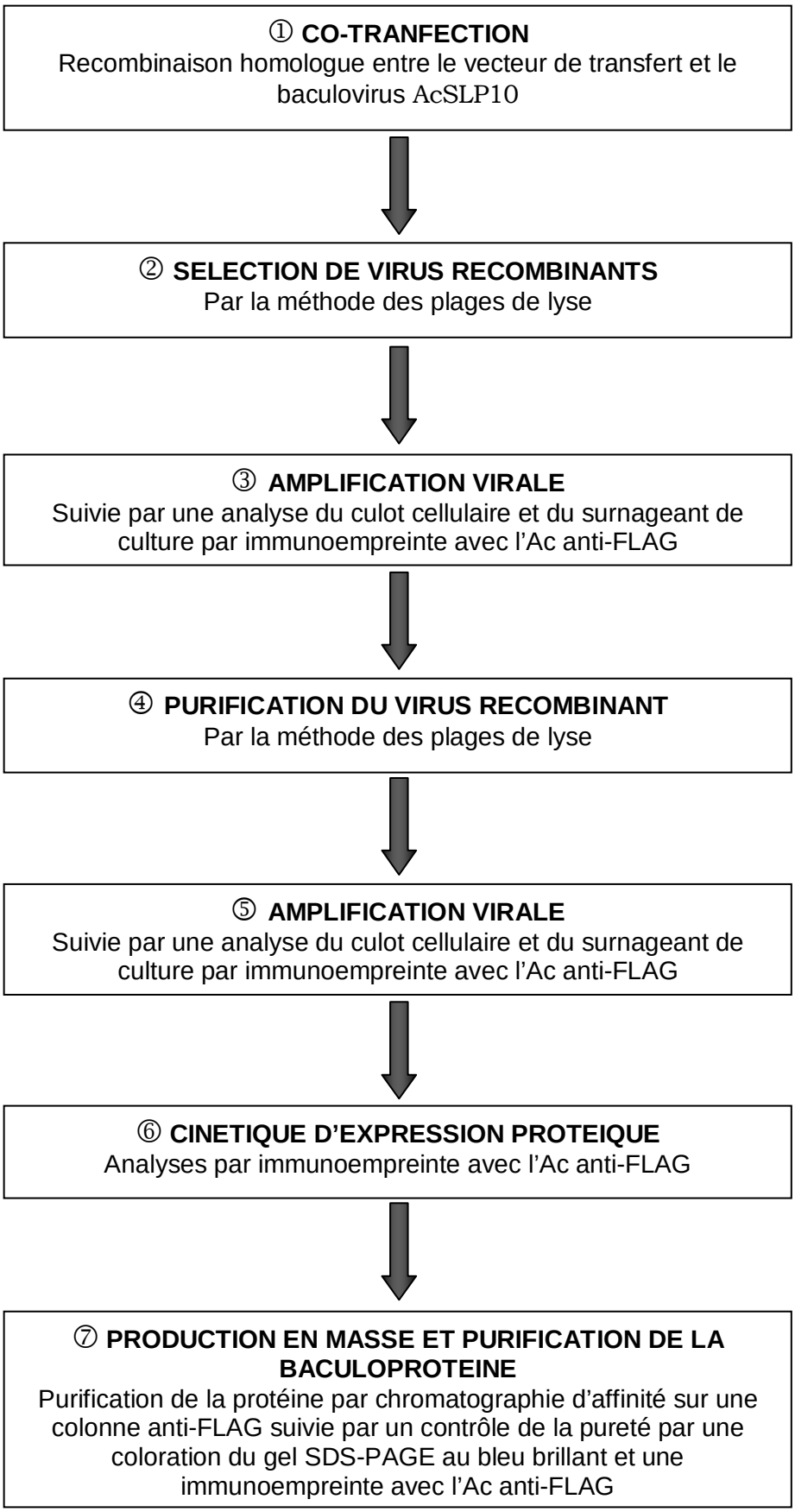


Figure 31. Organigramme des étapes expérimentales de la production de la baculoprotéine recombinante

Préparation du vecteur « cassette » de clonage

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) humaines sont isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Les ARN totaux sont ensuite extraits à partir de 10^7 PBMC à l'aide du réactif TRIzol™ (Life Technologies). La synthèse des ADNc est réalisée par transcription inverse de ces ARN avec une amorce oligo-dT (Invitrogen), en utilisant la M-MLV RT (Life Technologies). Un fragment d'ADN codant pour le peptide signal et le propeptide (SP) de la Dsg1 humaine est amplifié par PCR « nichée » à partir des ADNc générés. La double PCR est effectuée en utilisant les amorces SP sens (5´-CTT GGT CTT GGA TGT AAG AGA ATC C-3´) et SP reverse (5´-CTC CAG AGA TGC GGT ATG TAA CTT-3´) comme amorces externes et les amorces SP-*Bam*H I (5´-GAG ATG GAC TGG AGT TTC TTC AGA G-3´) et SP-*Hin*d/*Pfl*23 II (**5´-**CGT AAG CTT AGC GTA CGT TTC TGC CTT CGG ATT GAA TG-3´) comme amorces internes (Figure 32) en suivant les conditions d'amplification indiquées dans les tableaux 21 et 22.

Tableau 21. Composition du milieu réactionnel de PCR « nichée » pour l'amplification des séquences ADNc codant pour le peptide signal et le propeptide de la Dsg1 humaine

Réactifs	Volumes
Matrice (ADNc)	5 µl
Mélange des 4 dNTPs (25 mM chacun)	1,5 µl
Tampon de la *Taq*DNA Polymérase	5 µl
Amorces sens (100 pmol/µl) + antisens (100 pmol/µl)	0,5 µl + 0,5 µl
*Taq*DNA Polymérase (Perkin-Elmer)	1,5 U
H_2O	q.s.p. 50 µl

Tableau 22. Phases de l'amplification par PCR « nichée »* des séquences ADNc codant pour le peptide signal et le propeptide de la Dsg1 humaine

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	3 min	94 °C	1
Dénaturation	1 min	94 °C	
Hybridation	30 s	60 °C	35
Elongation	1 min	72 °C	
Elongation finale	5 min	72 °C	1

* : Ces conditions sont celles des 2 PCR successives

```
TGA GTG GGA GAA AGG AAA AGA ACA GAG AAG AAC AAA CAA AAC TCC CTT GGT CTT      54
                            >S
GGA TGT AAG AGA ATC CAG CAG AGA TGG ACT GGA GTT TCT TCA GAG TAG TTG CAG     108
        Amorce SP Sens          E1 Amorce SP-BamH I  >P
TGC TGT TCA TTT TTC TGG TGG TGG TAG AAG TTA ACA GTG AAT TCC GAA TCC AGG     162
                    E2                                              E3
TAA GAG ATT ATA ACA CTA AAA ATG GCA CCA TCA AAT GGC ATT CAA TCC GAA GGC     216
            >EC1                                   Amorce SP-Hind/Pfl23 II
AGA AAC GTG AAT GGA TCA AGT TCG CAG CAG CCT GTC GTG AAG GTG AAG ACA ACT     270
                                    Amorce rEC1/5-S
CAA AGA GGA ACC CAA TCG CCA AAA TTC ACT CAG ATT GTG CTG CAA ACC AGC AAG     324
                                E4
TTA CAT ACC GCA TCT CTG GAG TAG GAA TTG ATC AGC CAC CAT ATG GGA TCT TTG     378
            Amorce SPAntisens
TCA TTA ATC AGA AAA CTG GTG AAA TTA ATA TAA CAT CCA TAG TTG ATC GAG AGG     432

TCA CTC CTT TCT TCA TTA TCT ACT GCC GAG CTC TGA ACT CAA TGG GCC AAG ATT     486
                        E5
TAG AGA GGC CTC TAG AGC TCA GAG TCA GGG TTT TGG ATA TAA ATG ACA ACC CTC     540
            >EC2
CAG TGT TTT CAA TGG CTA CAT TTG CAG GAC AAA TAG AAG AAA ATT CTA ATG CAA     594
                                                                    E6
ATA CAC TGG TGA TGA TAC TCA ATG CTA CTG ACG CAG ATG AAC CGA ACA ATT TGA     648

ACT CAA AAA TAG CCT TCA AGA TTA TAA GAC AAG AAC CTT CAG ATT CAC CAA TGT     702

TTA TTA TCA ACA GAA ATA CTG GAG AAA TTC GAA CGA TGA ATA ATT TTC TAG ACA     756

GAG AGC AAT ACG GCC AGT ATG CTC TTG CTG TAA GAG GCT CTG ACC GAG ATG GTG     810
        E7
GGG CAG ATG GCA TGT CAG CGG AAT GTG AGT GCA ACA TTA AAA TCC TCG ATG TCA     864
                        >EC3
ATG ATA ATA TCC CTT ACA TGG AAC AGT CTT CAT ATA CCA TAG AAA TTC AAG AAA     918
                            E8
ATA CTC TAA ATT CAA ATT TGC TCG AGA TTA GAG TAA TTG ATT TGG ATG AAG AGT     972

TCT CAG CTA ACT GGA TGG CAG TAA TTT TCT TTA TCT CTG GAA ATG AAG GAA ATT    1026

GGT TTG AGA TAG AAA TGA ATG AAA GAA CAA ATG TGG GAA TTT TAA AGG TTG TTA    1080
                                                            E9
AGC CCT TAG ATT ATG AAG CTA TGC AGA GTC TGC AAC TCA GTA TTG GTG TCA GAA    1134

ATA AAG CTG AAT TTC ATC ATT CAA TTA TGT CTC AAT ATA AAC TGA AAG CAT CTG    1188
                                                        >EC4
CAA TTT CTG TGA CTG TGT TAA ATG TAA TTG AAG GCC CAG TGT TTC GTC CAG GTT    1242

CAA AGA CAT ATG TTG TAA CTG GTA ATA TGG GAT CAA ATG ATA AAG TGG GAG ACT    1296

TTG TAG CTA CTG ACC TGG ACA CAG GTA GAC CTT CAA CGA CTG TTA GGT ATG TAA    1350
                                                            E10
TGG GAA ATA ATC CAG CTG ACC TGC TAG CTG TTG ATT CAA GAA CAG GCA AAC TCA    1404

CTT TGA AAA ATA AAG TTA CCA AGG AAC AGT ACA ATA TGC TCG GAG GAA AAT ACC    1458

AAG GAA CGA TTC TCT CTA TAG ATG ATA ATC TTC AAA GAA CTT GCA CTG GTA CAA    1512
                                E11                 >EC5
TTA ATA TTA ACA TTC AAA GTT TTG GTA ATG ACG ACA GGA CTA ATA CAG AGC CGA    1566

ACA CTA AAA TTA CTA CCA ATA CTG GCA GAC AAG AAA GTA CTT CTT CCA CTA ACT    1620

ATG ATA CCA GCA CAA CTT CTA CTG ACT CTA GCC AAG TAT ATT CTT CTG AAC CCG    1674

GAA ACG GAG CCA AAG ATT TGT TAT CAG ACA ATG TAC ATT TTG GTC CTG CTG GCA    1728
                                                Amorce rEC1/5-R
```

Figure 32. Séquence nucléique codant pour la région extracellulaire de la desmogléine 1 humaine. Les séquences sur lesquelles s'hybrident les amorces utilisées pour les différentes amplifications par PCR sont surlignées en couleur. Un fragment d'ADN codant pour le peptide signal (S) et pour le propeptide (P) de la Dsg1 sont amplifiés par PCR « nichée » à partir des ADNc générés par transcription reverse en utilisant les amorces SP sens et SP reverse comme amorces externes et les amorces SP-*Bam*H I et SP-*Hin*d/*Pfl*23 II comme amorces internes. Le fragment d'ADNc codant pour les domaines extracellulaires EC1 à EC5 de la protéine est obtenu par PCR en utilisant les amorces rEC1/5-S et rEC1/5-R, s'hybridant respectivement à l'extrémité 5´ de la séquence codant pour le domaine EC1 et à l'extrémité 3´ de celle codant pour le domaine EC5. Les exons (E) sont indiqués sous la séquence nucléique.

Les produits de PCR (180 pb), préalablement contrôlés sur gel, sont purifiés par le kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen Inc.) et quantifiés en référence au marqueur de taille 100 bp (GibcoBRL Life technologies) après migration électrophorètique sur un gel d'agarose à 1,5%. Les ADNc SP et le vecteur pGEM4Z (Promega, Madison, WI) sont ensuite double digérés par les enzymes de restriction *Bam*H I et *Hin*d III (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) (Tableau 23). Les produits digérés sont contrôlés sur gel d'agarose 1%, purifiés et quantifiés comme précédemment décrit. La ligation de l'insert (17 ng) avec le vecteur pGEM4Z (83 ng) s'effectue durant 1 h à 37°C en présence d'1 unité (U) de T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc.) diluée dans son tampon. Cinq µl du milieu de ligation sont ajoutés à 100 µl de bactéries compétentes DH5α (GibcoBRL Life technologies). Une incubation de 30 min dans la glace et un choc thermique de 45 sec à 42°C suivis d'une incubation de 2 min dans la glace permettent la transformation des bactéries compétentes. Les bactéries transformées sont cultivées 1 h à 37°C dans 500 µl de milieu LB liquide (10 g/l de N-bactotryptone, 5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l de NaCl). La solution bactérienne est étalée à raison de 100 µl sur un milieu LB-agar : LB liquide, 15 g/l d'agar, contenant 50 µg/ml d'ampicilline. Les boîtes sont incubées la nuit à 37°C. Le vecteur pGEM4Z possède un gène de résistance à l'ampicilline. Seules les bactéries ayant incorporées le plasmide se développent sur le milieu de sélection contenant l'antibiotique. Afin de ne sélectionner que les clones transformés par le plasmide recombinant, une PCR de vérification sur colonie est réalisée en utilisant les amorces M13S (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' et M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') (Tableaux 24 et 25).

Tableau 23. Composition du mélange réactionnel de la double digestion par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hin*d III

	pGEM4Z	**Produit de PCR SP**
Matrice	300 ng	5 µg
Tampon *Bam*H I 10X	5 µl	5 µl
*Bam*H I (1U/µl)	1 µl	5 µl
*Hin*d III (1U/µl)	1 µl	5 µl
BSA 100X	0,5 µl	0,5 µl
Eau	Qsp 50 µl	
°C/min	37°C/60 min*	

* : cette étape de digestion est suivie par une incubation de 10 min à 65°C.

Tableau 24. Composition du mélange réactionnel de la PCR utilisant les amorces M13

Réactifs	Volumes
Matrice ADNc	Inoculum bactérien
Mélange des 4 dNTPs (40 mM chacun)	0,75 µl
Tampon de la *Taq*DNA Polymérase	5 µl
Amorces M13S (100 pmol/µl) + M13R (100 pmol/µl)	0,25 µl + 0,25 µl
MgCl2 25 mM	3 µl
BSA	0,25 µl
*Taq*DNA Polymérase (MBI Fermentas)	2,5 U
H_2O	q.s.p. 50 µl

Tableau 25. Phases de la réaction de PCR utilisant les amorces M13

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	3 min	94 °C	1
Dénaturation	1 min	94 °C	
Hybridation	30 s	55 °C	35
Elongation	30 s	72 °C	
Elongation finale	5 min	72 °C	1

La taille des produits de PCR (650 pb) est ensuite contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5%. Les clones positifs comportant un insert ayant la taille attendue, sont repiqués sur du milieu LB-agar (ampicilline 50 µg/ml) et cultivés durant la nuit à 37°C. Une préculture de 2 ml de LB (ampicilline 50 µg/ml) est ensemencée avec chaque clone et incubée durant 8 h à 37°C. La culture bactérienne est centrifugée à 5000 g durant 10 min à 4°C. L'extraction plasmidique est réalisée à l'aide du kit Qiagen plasmid purification (Qiagen Inc.). Après vérification de sa taille par électrophorèse sur un gel d'agarose, l'ADN plasmidique est quantifié par spectrophotométrie à 280 nm. La séquence ADN du plasmide comportant l'insert est séquencée en utilisant le kit Big Dye® Terminator v3.1 Cycle sequencing (Applied Biosystems, Warrington, UK) à l'aide des amorces M13S et M13R (Tableaux 26 et 27).

Tableau 26. Composition du mélange réactionnel de séquençage sur le séquenceur 16 capillaires AB3100 (Applied Biosystems)

Réactifs	Volumes
Matrice ADN (30 à 100 ng)	1 µl
Tampon 5X (Applied Biosystems)	1,5 µl
Amorces M13 (3,2 µM)	1 µl
Prémix du kit (Applied Biosystems)	1 µl
Eau	5,5 µl

Tableau 27. Phases de la réaction de séquençage sur le séquenceur 16 capillaires AB3100 (Applied Biosystems)

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	2 min	95 °C	1
Dénaturation	10 sec	96 °C	
Hybridation	5 sec	50 °C	30
Elongation	3 min	72 °C	

Les produits sont ensuite purifiés de la manière suivante : 1 µl d'EDTA 125 mM, 1 µl d'acétate de sodium et 25 µl d'éthanol 100% sont ajoutés à chacun des essais. Le mélange est incubé 15 min à température ambiante puis centrifugé 30 min à 1200 g. Le surnageant est éliminé, le culot d'ADN est lavé avec 35 µl d'éthanol 75% et centrifugé 10 min à 1200 g. Le surnageant est éliminé et le culot préalablement séché est repris dans 15 µl de formamide (Sigma). Les réactions de séquences sont transférer sur la plaque du séquenceur capillaire et dénaturé 2 min 30 à 95°C puis, analysées avec le séquenceur 16 capillaires AB3100 (Applied Biosystems). Les séquences obtenues sont comparées, grâce au programme BLAST, à celles contenues dans les banques de données disponibles sur Internet.

Le vecteur pGEM4Z comportant l'insert SP (5 µg) subit une double digestion par les enzymes de restriction *Pfl*23 II (10 U) (MBI Fermentas) et *Hin*d III (6 U) (New England Biolabs Inc.) durant une nuit à 37°C pour permettre l'introduction de séquences dites « TAG » codant pour le peptide FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) et 6 résidus histidine ainsi qu'un codon stop. Ces séquences sont clonées dans le vecteur digéré par la technique des dimères d'oligonucléotides. Elles utilisent 2 oligonucléotides complémentaires en leur centre et protubérants à leurs extrémités en site de restriction *Pfl*23 II et *Hin*d III : FLAG-S, 5'-GTACG-*GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG*-CAT CAT CAC CAT CAC CAT-**TA**-3' (site *Pfl*23 II-*FLAG*-His-**STOP**, site *Hin*d III); FLAG-R, 3'-AGC-**TTA**-ATG GTG ATG GTG ATG ATG-*CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC*-C-3' (site *Hin*d III-**STOP**-His, *FLAG*-site *Pfl*23 II). L'oligonucléotide FLAG-S (100 pmol) subit une phosphorylation en présence d'ATP (1 mM) grâce à la T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs Inc.) durant 30 min à 37°C puis l'étape de ligation est réalisée comme décrite dans le tableau 28. Les étapes de transformation des bactéries compétentes, de criblage par PCR des clones positifs et de séquençage grâce aux amorces M13 sont identiques à celles décrites précédemment. Le vecteur pGEM4Z-SP-TAG résultant contient un site de clonage unique *Pfl*23 II permettant le clonage de l'insert codant pour la région EC de la Dsg1 et des séquences TAG utilisables pour contrôler sa production par immunoempreinte ainsi que sa purification par chromatographie d'affinité (Figure 33).

Tableau 28. Conditions expérimentales de la ligation entre le vecteur pGEM4Z-SP et les séquences codant les peptides FLAG et Histidine

Réactifs	
pGEM4Z-SP double digéré	3 pmol
Oligo FLAG-R	3 pmol
Oligo FLAG-S phosphorylé	3 pmol
Eau	Qsp 17 µl
Hybridation des oligonucléotides	*5 min à 80°C puis refroidissement à température ambiante*
T4 DNA ligase 1 U/µl (Biolaps)	1 µl
Tampon de la T4 DNA ligase 10X	2µl
Ligation	*3 h à température ambiante*

pGEM4Z

CCCGG*GAGTCC*CGAG***ATG***GACTGGAGTTTCTTCAGAGTAGTTGCAGT

BamH I Peptide signal

GCTGTTCATTTTTCTGGTGGTGGTAGAAGTTAACAGTGAATTCCGAAT

Propeptide

CCAGGTAAGAGATTATAACACTAAAAATGGCACCATCAAATGGCATT

CAATCCGAAGGCAGAAA*CGTACG*GACTACAAGGACGACGATGACAA

Pfl23 II FLAG

GCATCATCACCATCACCAT**TAA***GCTT*GTCTCCC

Histidines **Stop** *Hin*d III

pGEM4Z

Figure 33. Structure de la « cassette » de clonage du vecteur pGEM4Z-SP-TAG.

Clonage de la région extracellulaire de la desmogléine 1

La séquence d'ADN codant pour la région EC de la Dsg1 humaine est amplifiée par PCR à partir des ADNc générés à l'aide des amorces rEC1/5-S (5´-GAA TGG ATC AAG TTC GCA GCA GCC-3´) et rEC1/5-R (5´-CGG CGT ACG AGG ACC AAA ATG TAC ATT GTC TG-3´) (Figure 32, tableaux 29 et 30). Les produits de PCR (1497 pb), préalablement contrôlés sur gel, sont purifiés et quantifiés comme précédemment décrit. Le produit de PCR rEC1/5-Dsg1 et le vecteur cassette sont digérés par l'enzyme *Pfl*23 II (Tableau 31). Les produits digérés sont contrôlés sur gel d'agarose 0,8%, purifiés et quantifiés comme précédemment décrit. La ligation de l'insert (25 ng) avec le vecteur cassette préalablement déphosphorylé (175 ng) s'effectue durant 1 h à 37°C en présence d'1 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc.). Les étapes de transformation des bactéries compétentes, de criblage par PCR des clones positifs et de séquençage grâce aux amorces M13 sont identiques à celles décrites précédemment.

Tableau 29. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification par PCR de la séquence ADNc codant pour la région extracellulaire de la Dsg1

Réactifs	Volumes
Matrice (ADNc)	1 µl
Mélange des 4 dNTPs (10 mM chacun)	1,5 µl
Tampon de la *Taq*DNA Polymérase 10X	10 µl
MgCl2 25 mM	6 µl
Amorces rEC1/5-S (100 pmol/µl) + rEC1/5-R (100 pmol/µl)	0,5 µl + 0,5 µl
*Taq*DNA Polymérase (MBI Fermentas)	0,5 µl
BSA	0,5 µl
H_2O	q.s.p. 100 µl

Tableau 30. Phases de la réaction de PCR pour l'amplification de la séquence ADNc codant pour la région extracellulaire de la Dsg1

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	3 min	94 °C	1
Dénaturation	1 min	94 °C	
Hybridation	1 min 30	58 °C	35
Elongation	3 min	72 °C	
Elongation finale	10 min	72 °C	1

Tableau 31. Mélange réactionnel de la digestion par l'enzyme Pfl23 II

	Vecteur cassette	Produit de PCR rEC1/5-Dsg1
Matrice	150 ng	6 µg
Tampons Y+/Tango™	5 µl	5 µl
*Pfl*23 II (3U/µl)	2 µl	2 µl
BSA 100X	0,5 µl	0,5 µl
Eau	Qsp 50 µl	
°C/min	37°C/une nuit*	

* : cette étape de digestion est suivi par une incubation de 10 min à 65°C

Préparation du vecteur de transfert

Le vecteur pGEM4Z-SP-TAG est double digéré par les enzymes *Bam*H I et *Hin*d III (New England Biolabs Inc.) pour permettre l'introduction de la cassette comportant l'insert rEC1/5-Dsg1 dans le vecteur de transfert p119 [Chaabihi, 1993] double digéré par les enzymes *Bgl* II et *Hin*d III (Tableau 32). Après leurs purifications et quantifications, la ligation de la cassette rEC1/5-Dsg1 (45 ng) avec le vecteur p119 (155 ng) s'effectue durant 1 h à 37°C en présence d'1 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc.) L'étape de transformation des bactéries compétentes est réalisée comme précédemment décrite. Le criblage des clones bactériens est réalisé par la PCR utilisant les amorces de clonage (rEC1/5-S et rEC1/5-R). Les plasmides sont extraits et séquencés avec l'amorce p119S (5'-GAA TCA TTC CAG CTT TTG GAC-3) selon le protocole déjà décrit. Une culture de 200 ml de milieu est ensemencée avec le clone bactérien d'intérêt (cultivé en préculture de 2ml de milieu) et incubée une nuit à 37°C. Le vecteur de transfert comportant l'insert rEC1/5-Dsg1 est ensuite extrait à l'aide du kit Qiagen plasmid purification (Qiagen Inc.).

Tableau 32. Composition du mélange réactionnel de la double digestion du vecteur de transfert p119

	p119
Matrice	10 µg
Tampon 2 10X	5 µl
Bgl II (10 U/µl)	1 µl
*Hin*d III (20 U/µl)	0,5 µl
Eau	Qsp 50 µl
°C/min	37°C/une nuit*

* : cette étape de digestion est suivie par une incubation de 10 min à 65°C.

Cotransfection des cellules d'insectes et production du virus recombinant

Les cellules d'insectes Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) sont co-transfectées avec le vecteur de transfert recombinant et l'ADN viral AcSLP10 [Chaabihi, 1993] par lipofection [Felgner and Ringold, 1989]. Il y a alors infection des cellules d'insectes puis synthèse de particules virales. AcSLP10 est un baculovirus modifié possédant une copie du gène codant pour la protéine polyédrine placée sous le contrôle du promoteur de la protéine P10. La recombinaison homologue entre le virus et le vecteur de transfert recombinant aboutit à la création d'un virus recombinant dans lequel le gène codant pour la polyédrine a été remplacé par la cassette recombinante. Les virus recombinants sont isolés par la technique des plages de lyse [Summers et Smith, 1987] (Figure 34).

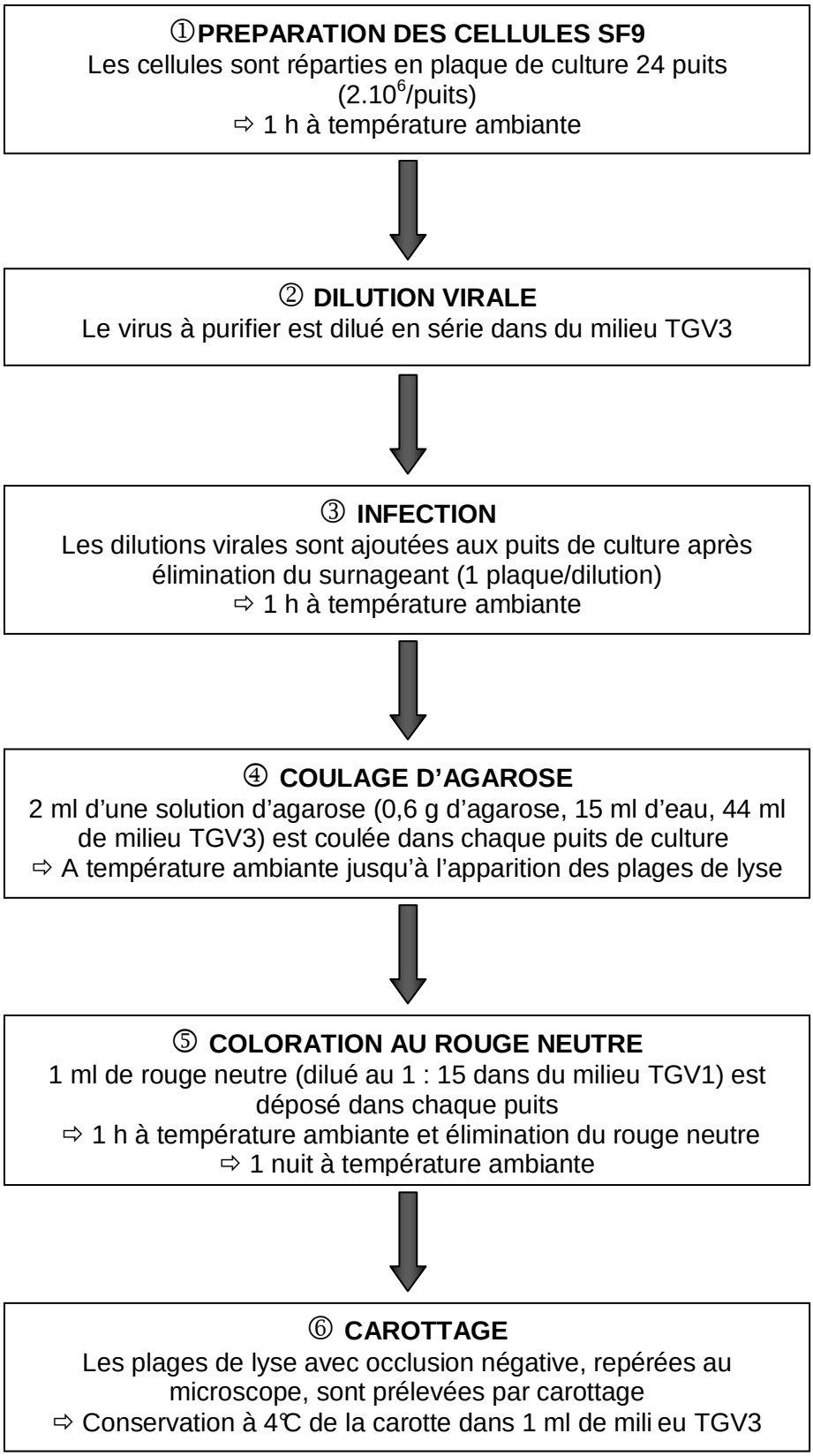


Figure 34. Organigramme des étapes expérimentales de la purification des baculovirus recombinants par la technique des plages de lyse

Les plages de lyse à phénotype « occlusion négative » sont différenciées de celles à phénotype « occlusion positive ». En effet, lorsque les cellules d'insectes sont infectées par un virus non recombinant, le gène de la polyédrine est exprimé et l'apparition d'inclusions sous forme de polyèdres est observée; il s'agit du phénotype « occlusion positive ». Lorsque les cellules d'insectes sont infectées par un virus recombinant, le gène de la polyédrine est substitué par l'insert recombinant, aucun polyèdre n'est observé; il s'agit du phénotype « occlusion négative ». Les plages de lyse qui correspondent à un virus recombinant sont dénombrées afin de déterminer le titre viral du surnageant initial. L'isolement des virus recombinants se fait en prélevant par carottage les plages de lyse isolées.

Les virus recombinants sont ensuite amplifiés de la façon suivante. Une suspension cellulaire à 10^6 cellules Sf9/ml de milieu Sf900 II (Invitrogen) est cultivée 1h à température ambiante. Le surnageant est éliminé, la suspension virale (0,3 ml) et du milieu Sf900 II, SVF 2,5% sont ajoutés à la culture qui est incubée 1 h à température ambiante. Les cellules sont ensuite cultivées 4 à 5 j à température ambiante après addition de milieu Sf900 II, SVF 2,5% (4 ml). Le surnageant de culture et le culot cellulaire sont récupérés après centrifugation 5 min à 5000 rpm, 4°C et conservés. Une seconde amplification est réalisée à partir des clones issus des surnageants de l'amplification précédente ceci, dans le but d'obtenir un stock de virus nécessaire à la production de la protéine. Les protéines contenues dans les surnageants et les culots cellulaires récupérés à la suite des 2 amplifications successives sont séparées par une électrophorèse *SDS* (*sodium dodecyl sulfate*)-*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dans un gel de polyacrylamide de porosité 14% (Tableau 33) et analysés par immunoempreinte en utilisant un Ac anti-FLAG (Sigma) et des Ac secondaires de chèvre anti-IgG de souris couplés à peroxydase selon la procédure expérimentale décrite ultérieurement.

Tableau 33. Composition du gel de polyacrylamide de porosité 14% utilisé pour la séparation électrophorètique des protéines par SDS-PAGE

Solution	Gel de séparation*	Gel de concentration**
Acrylamide/,BIS 40%	8,75 ml	1,2 ml
Tris 1 M pH 8,8	9,4 ml	
Tris 0,375 pH 6,8		4,2 ml
SDS 10%	250 µl	125 µl
Persulfate d'ammonium 50 g/l	625 µl	1 ml
TEMED	6,25 µl	5 µl
Eau	3,04 ml	6,1 ml

* : pour 4 mini-gels (7 cm x 6,5 cm x 1mm) ou 2 gels criterion (11 cm x 8 cm x 1 mm);
** : Ce gel de concentration est substitué par un gel d'agarose 0,1% pour la fabrication des gels utilisés lors de l'électrophorèse bidimensionnelle.

Production et purification de la protéine rEC1/5-Dsg1

La cinétique d'expression est réalisée avec les cellules Sf9 infectées avec le baculovirus recombinant codant pour la protéine rEC1/5-Dsg1 à des unités de multiplicité d'infection (m.o.i) de 1, 2, 5 ou 10. A différents temps, un aliquot de surnageant est prélevé pour être analysé en immunoempreinte avec l'Ac anti-FLAG. Pour une expression à large échelle, 5×10^8 cellules Sf9 sont infectées durant 1h avec 20 ml de milieu contenant le virus recombinant à une m.o.i de 1 puis, sont transférées dans 480 ml de milieu Sf900 II (Invitrogen) et cultivées à 28°C durant 96 h. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée 15 min à 5000 rpm et le surnageant est récupéré et conservé à -80°C en vue de la purification de la baculoprotéine rEC1/5-Dsg1.

Le surnageant contenant la protéine rEC1/5-Dsg1, comportant la séquence FLAG, est introduit dans une colonne de chromatographie d'affinité anti-FLAG équilibrée avec une solution de 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (TBS), 30 µg/ml E64 (Roche, Mannheim, Germany), leupeptine à 10 µg/ml et pepstatine à 10 µg/ml. La colonne est lavée avec 40 ml de tampon TBS et la protéine fixée est éluée par compétition avec 15 ml d'une solution de TBS contenant l'octapeptide FLAG (0,1 mg/ml). Des fractions (1 ml) sont collectées, séparées par électrophorèse SDS-PAGE et analysées par immunoempreinte avec l'Ac anti-FLAG. Les fractions contenant la protéine recombinante sont rassemblées et subissent une concentration à l'aide de centrifugation sur des filtres Ultrafree-15 (Millipore, Billerica, MA).

2/ SYNTHESE DE LA FORME TRONQUEE DE LA DESMOGLEINE 1

L'isoforme tronquée de la Dsg1 a été obtenue sous une forme recombinante, appelée EC1/2-INT6, en utilisant un système de transcription/traduction *in vitro*.

Amplification de l'ADNc codant pour la protéine EC1/2-INT6

Les ADNc générés à partir des ARN totaux extraits de l'épiderme humain (méthode décrite précédemment) sont utilisés pour amplifier par PCR la séquence codante pour la protéine EC1/2-INT6. Dans un volume total de 100 µl, 10 µl d'ADNc sont mis en présence de 0,5 µM de chaque amorce (amorce sens : 5´-GAA TGG ATC AAG TTC GCA GCA G-3´ et amorce reverse : 5´-TTA CTT TGT CTT ATG TAA AGT TCT TTG-3´) (GibcoBRL Life technologies) (Tableau 34 et 35). Les produits de PCR sont purifiés par le kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen Inc.) et quantifiés en référence au marqueur de taille 100 bp (GibcoBRL Life technologies) après électrophorèse sur un gel d'agarose à 3%.

Tableau 34. Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification de la séquence ADNc codant pour la protéine EC1/2-INT6

Réactifs	Volumes
Matrice (ADNc)	5 µl
Mélange des 4 dNTPs (10 mM chacun)	1 µl
Tampon de la *Taq*DNA Polymérase	5 µl
Amorces sens (100 pmol/µl) + antisens (100 pmol/µl)	0,25 µl + 0,25 µl
*Taq*DNA Polymérase DyNazyme™ EXT (Finnymes Oy)	1µl
H_2O	q.s.p. 50 µl

Tableau 35. Phases de l'amplification par PCR de la séquence ADNc codant pour la protéine EC1/2-INT6

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	3 min	94 °C	1
Dénaturation	1 min	94 °C	
Hybridation	1 min	61 °C	35
Elongation	1 min	72 °C	
Elongation finale	5 min	72 °C	1

Clonage de l'insert codant pour la protéine EC1/2-INT6

Les amplimères sont digérés durant une nuit à 37°C dans un volume total de 50 µl contenant 522 ng d'ADNc codant pour EC1/2-INT6 et 20 U des enzymes de restriction ; *Apa*I et *Bam*HI (Stratagene, La Jolla, CA) dans leur tampon respectif. Le vecteur de traduction *in vitro* pSPUTK (Stratagene) est digéré 2 h à 37°C dans les mêmes conditions réactionnelles. L'insert EC1/2-INT6 et le plasmide pSPUTK digérés sont respectivement purifiés à l'aide des kits QIAquick gel extraction et Qiagen plasmid purification (Qiagen Inc.) et quantifiés après migration par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% en référence au marqueur de bas poids moléculaire (GibcoBRL Life technologies). La ligation de l'insert (120 ng) avec le vecteur pSPUTK (250 ng) s'effectue durant une nuit à 16°C en présence de 20 U/µl de T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc.) diluée dans son tampon. Dix µl du milieu de ligation sont ajoutés à 100 µl de bactéries compétentes DH5α

(GibcoBRL Life technologies). La transformation des bactéries compétentes et leur culture ont été décrites précédemment.

Le vecteur pSPUTK possède un gène de résistance à l'ampicilline. Seules les bactéries ayant incorporées le plasmide se développent sur le milieu de sélection contenant l'antibiotique. Afin de ne sélectionner que les clones transformés par le plasmide recombinant, une PCR de vérification sur colonie est réalisée en utilisant les amorces SP6 (5´-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT A-3´) et T7 (5´-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3´) (Invitrogen) spécifiques des séquences qui flanquent le site de clonage du vecteur pSPUTK (Tableau 36 et 37).

Tableau 36. Composition du mélange réactionnel de la PCR utilisant les amorces SP6 et T7

Réactifs	Volumes
Matrice (ADNc)	Inoculum bactérien
Mélange des 4 dNTPs (10 mM chacun)	1 µl
Tampon de la *Taq*DNA Polymérase	5 µl
Amorces SP6 (100 pmol/µl) + T7 (100 pmol/µl)	1 µl + 01 µl
*Taq*DNA Polymérase (Roche)	0,25 µl
H_2O	q.s.p. 50 µl

Tableau 37. Phases de la réaction de PCR utilisant les amorces SP6 et T7

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	5 min	94 °C	1
Dénaturation	1 min	94 °C	
Hybridation	1 min	51 °C	30
Elongation	1 min	72 °C	
Elongation finale	5 min	72 °C	1

La taille des amplimères est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8% en référence au marqueur de taille 1kb (New England Biolabs Inc.). Les clones positifs comportant un insert ayant la taille attendue, sont repiqués sur du milieu LB-agar (ampicilline 50 µg/ml) et cultivés durant une nuit à 37°C. Une préculture de 2 ml de LB (ampicilline 50 µg/ml) est ensemencée avec chaque clone et incubée durant 8 h à 37°C. Une culture de 200 ml du même milieu est ensemencée avec 200 µl de préculture. Les bactéries transformées sont ensuite cultivées une nuit à 37°C. La culture bactérienne est centrifugée à 5000 g durant 10 min à 4°C. L'extraction plasmidique est réalisée à l'aide du kit Qiagen plasmid purification (Qiagen Inc.). Après vérification de sa taille par électrophorèse sur un gel d'agarose, l'ADN plasmidique est quantifié et séquencé (à l'aide des amorces SP6 et T7) comme précédemment décrit.

Synthèse *in vitro* de la protéine EC1/2-INT6

La production de la protéine EC1/2-INT6 est réalisée grâce au système TNT® SP6 quick coupled transcription/translation (Promega) qui combine les réactions de transcription et de traduction *in vitro* de protéines eucaryotes dans un lysat de réticulocytes de lapin. Ce système utilise le promoteur SP6 présent sur le plasmide pSPUTK *in vitro* Translation Vector (Stratagene) dans lequel est cloné l'insert codant pour la protéine EC1/2-INT6. La synthèse est réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl comprenant 2 µg de vecteur recombinant incubés avec 40 µl de TNT® SP6 quick Master Mix (extrait de réticulocytes), 1 µl de méthionine (1 mM) et 2 µl de Transcend™ tRNA pendant 1 h 30 à 30°C. Ce mélange réactionnel est ensuite dilué dans 100 µl de tampon TBS et incubé 7 min à 30°C. Après 2 lavages avec du tampon TBS, 100 µl de billes d'avidine SoftLink™ (Promega) sont mis en contact avec ce mélange réactionnel et homogénéisés toutes les 15 min pendant 1 h à 4°C. La purification des protéines traduites *in vitro* est basée sur l'affinité de la biotine pour l'avidine. En effet durant la traduction, l'utilisation de Transcend™ tRNA (Promega) permet d'incorporer à la protéine en cours de synthèse des résidus lysine biotinylés (Figure 35). Après 5 lavages avec du tampon TBS, les protéines fixées sur les billes sont décrochées par l'ajout de 75 µl d'une solution de Laëmmli (Tris 0,5 M pH 6,8, glycérol 20%, SDS 40%, bleu de Bromophénol 0,009%, DTT 10%) et chauffage pendant 5 min à 100°C. La production de la protéine est ensuite contrôlée, après migration électrophorètique SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide de porosité 14% (Tableau 33), par immunoempreinte en utilisant de la streptavidine couplée à la peroxydase (Promega) et une révélation par chimioluminescence.

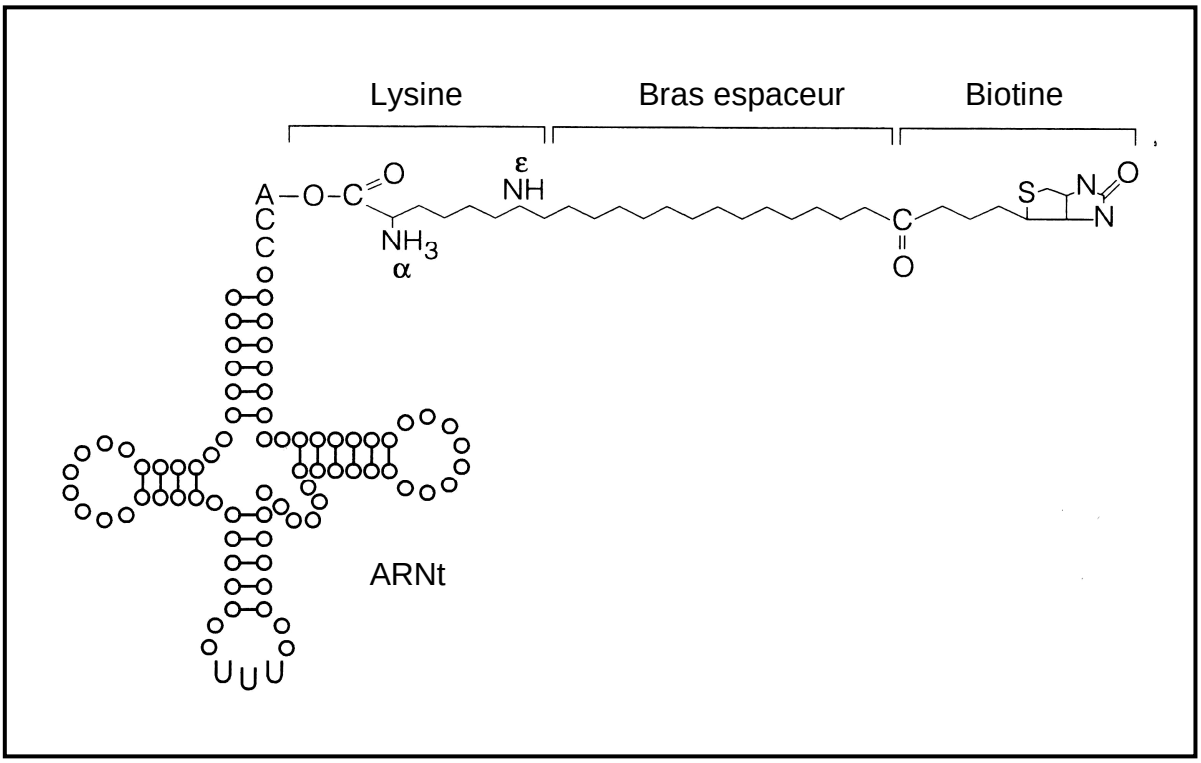


Figure 35. Structure du Transcend™ tRNA utilisé comme système de purification et de détection des protéines synthétisées par transcription/traduction *in vitro*. La lysine portée par l'ARN de transfert (ARNt) est liée par l'intermédiaire d'un bras espaceur, à une molécule de biotine. Les protéines en cours de traduction incorporent des résidus lysine biotinylés. Ce système permet à la fois la purification (basée sur l'affinité) des protéines synthétisées *in vitro*, sur une résine couplée à des molécules d'avidine ainsi que leur détection par immunoempreinte en utilisant de la streptavidine couplé à la peroxydase.

D- La production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-desmogléine 1 et d'anticorps polyclonaux dirigés contre son isoforme tronquée

Afin de mettre en évidence l'expression de l'isoforme tronquée de la Dsg1 dans l'épiderme humain, nous avons adopté une stratégie expérimentale basée sur la production de 2 anti-sérums spécifiquement dirigés contre cette protéine : le premier produit chez le lapin est dirigé contre le peptide de la région EC2 (184-194) ; et le second produit chez la souris est dirigé contre le peptide INT6 (Figure 35). Par ailleurs, afin d'obtenir des Acm anti-Dsg1, des souris CD1 et BALB/c ont été immunisées avec la baculoprotéine rEC1/5-Dsg1 purifiée.

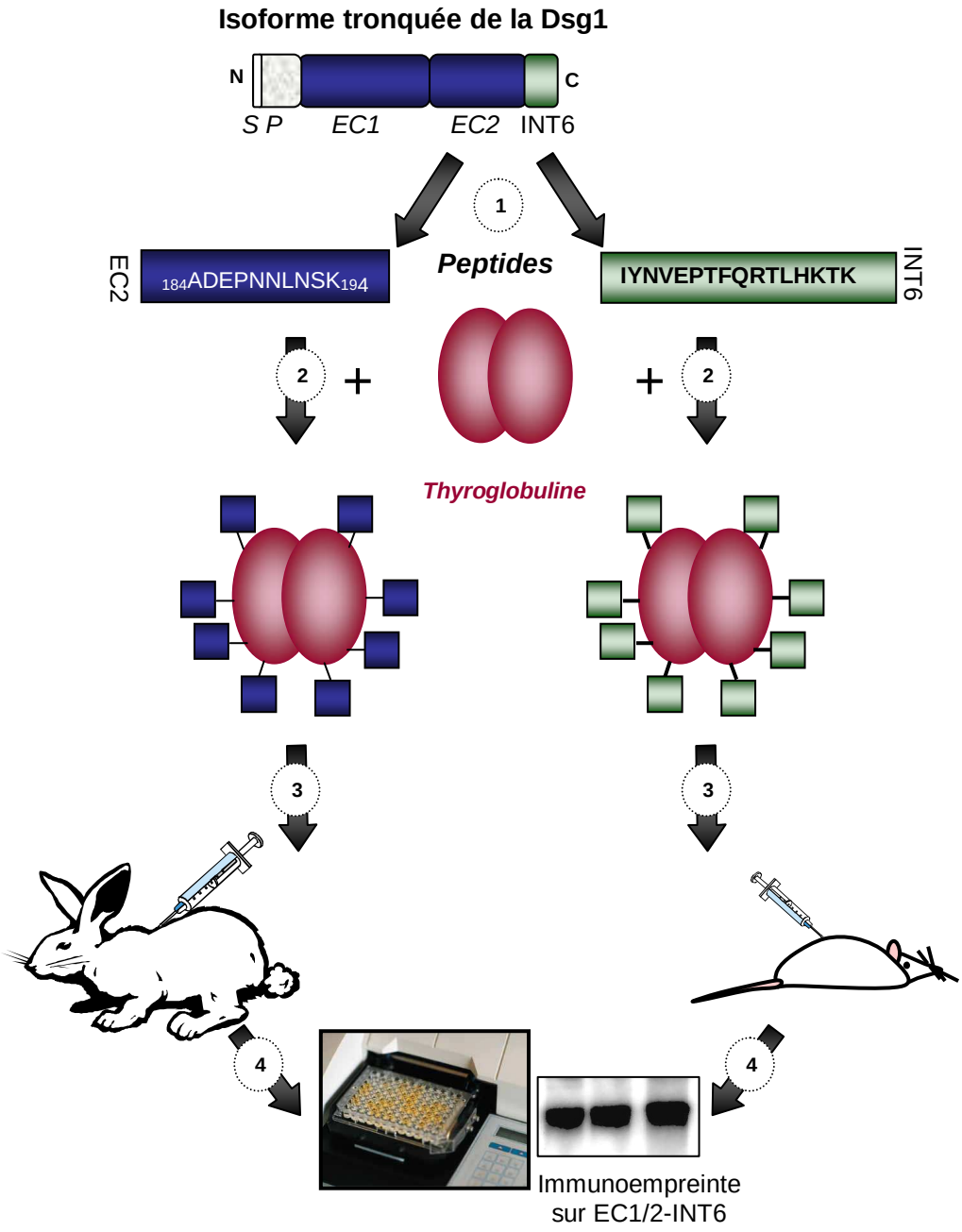


Figure 36. Représentation schématique des principales étapes de la production d'Ac polyclonaux anti-peptides de l'isoforme tronquée de la Dsg1. Deux peptides synthétiques correspondants à des séquences présentes sur l'isoforme tronquée de la Dsg1, les peptides EC2(184-194) et INT6 (1), sont couplés à la thyroglobuline bovine (TB) sous l'action d'une solution de glutaraldéhyde 0,025 M, selon le système haptène/protéine porteuse (2). Des lapins NZW et des souris CD1 sont respectivement immunisés avec les peptides EC2 et INT6 couplés à la TB (3). La présence d'IgG dirigées contre ces peptides dans le sérum des animaux est recherchée par des techniques d'ELISA utilisant les peptides comme Ag et d'immunoempreinte utilisant la protéine EC1/2-INT6 (isoforme tronquée recombinante) comme Ag (4).

1/ COUPLAGE DES PEPTIDES A LA THYROGLOBULINE BOVINE

Deux peptides de l'isoforme tronquée de la Dsg1 ont été synthétisés, purifiés (pureté >99%) et contrôlés par spectrométrie de masse (INSERM U413, IFRMP23, Mont Saint Aignan, France) en vue du protocole d'immunisation : le peptide INT6 (IYVNVEPTFQRTLHKTK) codé par une séquence présente sur l'insertion intronique (intron 6) et spécifique de l'isoforme tronquée de la Dsg1 ; le peptide EC2(184-193) (ADEPNNLNSK) choisi sur des critères d'hydrophobicité, d'accessibilité et d'antigénicité, est présent à la fois dans la Dsg1 et la forme tronquée. Ces peptides ont été couplés à la thyroglobuline bovine (TB), selon le système haptène/protéine porteuse d'après la procédure expérimentale suivante : 6,5 mg de chaque peptide sont dissous dans 0,5 ml d'HCl 1 mM et dilués dans 3,5 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 contenant 95 mg de TB (Sigma). Les solutions sont complétées avec 200 µl de tampon phosphate 0,05 M pH 7,5. Une solution de glutaraldéhyde 0,025 M (0,1 ml) est ajoutée aux solutions qui sont ensuite traitées à 5 min d'intervalle avec 9 fois 200 µl de glutaraldéhyde 0,025 M et 400 µl en final. Les mélanges réactionnels de couplage (6,5 ml au total) de chaque peptide sont dialysés durant 24 h à 4°C contre 1 l de tampon PBS. Les solutions de peptides couplés sont ajustées à 15 ml, aliquotées et conservées à -20°C.

2/ IMMUNISATION DES ANIMAUX

Des lapins NZW (*New Zealand White*) et des souris CD1 (Charles River Laboratories, L'arbresle, France) sont immunisés avec les peptides couplés à la TB selon le protocole d'immunisation suivant. Les souris et les lapins sont immunisés respectivement avec 40 µg de peptide INT6 (injection intrapéritonéale) et 200 µg de peptide EC2(184-193) (injection sous-cutanée) émulsifiés avec de l'adjuvant complet de Freund (ACF). Des rappels d'immunisation (8 au total) sont exécutés toutes les 3 semaines durant 7 mois avec une quantité identique de peptides couplés et émulsifiés avec de l'adjuvant incomplet de Freund (AIF).

Des souris CD1 et BALB/c (Charles River Laboratories) sont immunisées (injection intrapéritonéale) avec la protéine rEC1/5-Dsg1 purifiée (20 µg) émulsifiée avec de l'ACF. Les rappels d'immunisation (6 au total) sont exécutés tout les 10 j durant 2 mois avec une quantité identique de protéine émulsifiée avec de l'AIF puis 3 fois pendant la semaine précédant la fusion cellulaire.

Les prélèvements sanguins précédant chaque immunisation sont opérés sur une veine auriculaire du lapin et dans le sinus rétro-orbital de la souris puis, soumis à une décantation à 4°C durant une nuit avant d'être centrifugés 10 min à 3000 rpm. Le sérum prélevé au dessus du culot de globules rouges est aliquoté et conservé à -20°C.

3/ DETECTION DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES CHEZ LES ANIMAUX IMMUNISES

ELISA peptides

Les puits de plaques ELISA Maxisorp® (96 puits) (Nalge nunc internationnal, Roskilde, Danemark) sont recouverts par 100 µl d'une solution de peptide EC2(184-193) ou INT6 (10 µg/ml) durant une nuit à 4°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-tween 0,1% (PBS-T), les puits sont saturés avec 200 µl de tampon PBS-tween 1%, sucrose 5%, lait 3% durant 1 h à température ambiante. Les sérums de souris ou de lapin (100 µl), dilués au 1 :100 dans du tampon PBS-T, sérum albumine bovine 1% sont incubés pendant 1 h. Après 3 lavages, les puits sont incubés 1 h à température ambiante avec 100 µl d'Ac de chèvre anti-IgG de lapin ou de souris biotinylés (Caltag Laboratories, San Francisco, CA) (dilués au 1 :10000 dans du tampon PBS-T). Après 3 lavages, les puits sont incubés avec 100 µl de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (Caltag Laboratories) (diluée au 1 :10000 dans du tampon PBS-T) pendant 10 min. Enfin, les puits sont incubés avec 100 µl de solution de substrat (2 pastilles de *p*-nitrophényl phosphate, 9 ml de tampon NaCl 1,5 M, 1 ml de tampon Tris 1 M pH 9,8) durant 10 à 30 min à 30°C. Les lectures de densité optique (DO) sont effectuées à 405 nm sur le lecteur ELISA iEMS (Labosystems, Helsinki, Finland). Les essais sont réalisés en duplicate, et les valeurs de DO obtenues avec chaque sérum incubé sur des puits non recouverts de peptides sont soustraites à celles obtenues avec les sérums testés sur des puits recouverts de peptide. Afin de contrôler la spécificité des essais, les sérums pré-immuns sont inclus dans chaque expérience.

ELISA rEC1/5-Dsg1

Les puits de plaques ELISA Maxisorp® (Nalge nunc internationnal) sont recouverts par 100 µl d'une solution de la protéine rEC1/5-Dsg1 purifiée (10 µg/ml) durant une nuit à 4°C. Après 3 lavages avec une solution de TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 136 mM NaCl, 2,6 mM KCl), Tween 0,05% (TBS-T), 1 mM Ca^{2+}, les puits sont saturés avec 200 µl de TBS-T, 1 mM Ca^{2+}, sucrose 5%, lait 3% durant 1 h à température ambiante. Les puits sont incubés pendant 1 h avec les sérums de souris (1 : 50) ou les Acm (1 : 100) dilués dans du tampon TBS-T, 1 mM Ca^{2+}. Après 3 lavages, les puits sont incubés 1 h avec des Ac de chèvre anti-IgG de souris couplés à la phosphatase alcaline (Rockland, Gilbertsville, PA) (dilués au 1 : 2000 dans du tampon TBS-T, 1 mM Ca^{2+}). Après 3 lavages, la révélation s'effectue en incubant les puits avec 100 µl de solution de substrat (2 pastilles de *p*-nitrophényl phosphate, 9 ml de tampon NaCl 1,5 M, 1 ml de tampon Tris 1 M pH 9,8) durant 20 min à température ambiante. Les mesures de DO sont effectuées à 450 nm sur le lecteur ELISA iEMS (Labosystems). Les essais sont réalisés en duplicate.

Immunofluorescence indirecte (IFI)

Les sérums des souris CD1 et des lapins NZW immunisés avec les peptides couplés sont analysés par IFI sur des coupes de peau humaine. Les sérums des souris CD1 et BALB/c immunisées avec la protéine rEC1/5-Dsg1 ainsi que les Acm produits à partir de ces souris sont analysés sur des coupes de peau humaine et d'œsophage de souris. Les sections de tissus sont incubés avec les sérums des animaux immunisés (1 :25 et/ou 1 :50) ou avec les Acm (1 :100). Après 3 lavages en PBS, les sections sont incubées avec des Ac de chèvre anti-IgG de lapin couplés au FITC ou des d'Ac de chèvre anti-IgG de souris couplés au FITC (1 :100) (Sigma). Après lavages, les préparations sont montées entre lame et lamelle en milieu glycérol et, sont observées sous un microscope à fluorescence (Zeiss, Jena, Germany).

Immunoempreinte sur extrait protéique d'épiderme humain

L'extraction des protéines de l'épiderme humain est réalisée de la manière suivante. L'épiderme est séparé du derme par une incubation de la peau humaine de sujets sains dans une solution de NaCl 1M durant une nuit sous agitation. Les protéines sont extraites par l'incubation des fragments d'épiderme (détaché du derme) dans une solution de Tris 65 mM pH 6,8, SDS 2%, DTT 1mM, antiprotéases (10 ng/ml) (Sigma). Le mélange est ensuite traité aux ultrasons (Vibra Cell, Bioblock Scientific, Illkirch, France), chauffé 10 min à 100°C et centrifugés 30 min à 15000 rpm. Les solutions sont prélevées, conservés à -80°C ou utilisées immédiatement, diluées au 1 :2 dans du tampon de Laëmmli et chauffées 3 min à 100°C. Les protéines sont séparées par une migration électrophorètique SDS-PAGE de 2 h à 120 V dans un gel de polyacrylamide de porosité 4% Novex® (Invitrogen, Groningen, Netherlands) ou de 14% (Tableau 33). Le marqueur BenchMark™ (Invitrogen) est utilisé comme standard de poids moléculaire dans toutes les migrations SDS-PAGE. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose Hybond™-C extra (Amersham pharmacia biotech) durant 2 h à 30 V, les protéines sont colorées au rouge Ponceau (Sigma) et la membrane est décolorée dans une solution d'acide acétique 5%.

Les protéines fixées sur les bandelettes découpées à partir de la membrane sont tout d'abord saturées dans du tampon TBS-T, lait 5% durant 1h sous agitation. Après un lavage avec du tampon TBS-T, les protéines sont incubées 1 h avec les sérums des animaux (avant et après immunisation) ou avec les Acm (dilués respectivement au 1 : 50 et 1 :100 dans du tampon TBS-T, lait 5%). Après 4 lavages, les bandelettes sont incubées 1 h avec des Ac de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase (1 : 20 000) ou des Ac de lapin anti-IgG de souris couplés à la peroxydase (1 : 80 000). Après 4 lavages, les protéines immunoréactives sont révélées par chimioluminescence à l'aide des solutions

ECL™ (Amersham pharmacia biotech). Certaines expériences d'immunoempreinte sont réalisées à l'aide d'une révélation fluorescente à 2 couleurs détectée dans l'infrarouge et seront détaillées ultérieurement (immunoempreinte à fluorescence infrarouge).

4/ PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Génération des hybridomes

Les cellules de myélome SPO/2 (ATCC, Manassas, VA) sont cultivées dans du milieu complet RPMI 1640 (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgique), SVF 20%, antibiotiques-antimycotiques (Gibco), pyruvate 1 mM (Sigma) jusqu'à leur phase exponentielle de croissance. Après 3 lavages avec du milieu RPMI 1640, les cellules de myélome et les cellules isolées de la rate des souris produisant des IgG dirigées contre la Dsg1 (et contre d'autres protéines épidermiques) sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez, après coloration au bleu de Trypan (Gibco BRL). Les 2 suspensions cellulaires sont ensuite mélangées à raison d'un *ratio* cellules de myélome/cellules spléniques de 1/5 à 1/10. Le mélange cellulaire est centrifugé 10 min à 1500 rpm, le surnageant est éliminé et le culot subit une seconde centrifugation de 30 sec à 2500 rpm. Le surnageant est éliminé et du polyéthylène glycol (PEG) (Sigma) dilué au 1 : 2 avec du milieu RPMI 1640, préalablement chauffé à 37°C, est ajouté au mélange cellulaire à raison de 0,5-1 ml en 1 min (en agitant le tube dans de l'eau à 37°C pendant) suivi par une agitation douce de 2 min à l'aide de la pointe de la pipette. Le mélange est dilué avec du milieu RPMI 1640 (2 ml en 2 min puis 7 ml en 3 min). Les cellules centrifugées 10 min à 700 rpm sont remises en suspension à raison de 10^5 cellules/ml de milieu complet auquel est ajoutée une solution d'hypoxanthine 20 µM, thymidine 0,32 µM (HT Media Supplement (50×) Hybri-Max, Sigma), aminoptérine 4 nM (Sigma), à raison de 2 ml pour 100 ml de suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite réparties dans les puits de plaques de culture 96 puits (Costar, Cambridge, MA) contenant des macrophages péritonéaux de souris BALB/c et cultivées à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO^2 pendant 1 semaine. A partir de 8 j, les clones hybrides apparaissent, le milieu qui les contient est remplacé par du milieu complet neuf. Lorsque les clones occupent le tiers du puits, les surnageants sont prélevés dans le but de rechercher la présence d'IgG anti-Dsg1 par les techniques d'ELISA en utilisant la protéine rEC1/5-Dsg1 comme Ag et par IFI sur coupe d'épiderme humain. Préalablement à l'étape de clonage, les puits contenant des clones produisant des IgG dirigés contre les Ag d'intérêt sont transférés dans des puits (2 ml de milieu complet) de plaque 24 puits (Costar) et peuvent être conservés par congélation une fois les cellules expandues.

Clonage des hybridomes

Le clonage est réalisé par dilution limite. Ce procédé consiste à répartir la suspension cellulaire d'hybridomes pour obtenir une cellule par puits. Les cellules issues du puits d'intérêt sont diluées avec du milieu complet et, réparties dans les puits de plaque (96 puits) contenant des thymocytes de souris BALB/c. Les cellules sont ensuite cultivées à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO^2 pendant 1 semaine. Lorsque les puits ne contiennent qu'un seul clone et que sa taille est suffisante, le surnageant est prélevé pour rechercher la présence d'Ac dirigés contre les Ag épidermiques d'intérêt. Les puits sont dédoublés afin d'augmenter la taille de la culture et les clones positifs cultivés sont centrifugés 10 min à 1200 rpm. Le culot cellulaire est resuspendu dans 300 µl de SVF puis 500 µl de RPMI 1640, SVF 10%, DMSO 20% sont ajoutés avant la conservation à -80°C du clone numéroté.

E- L'identification des protéines épidermiques cibles par immunocriblage

1/ IMMUNOCRIBLAGE DE CARTE PROTEIQUE 2D D'EPIDERME HUMAIN (Figure 37)

Préparation d'un extrait protéique d'épiderme humain

La procédure expérimentale utilisée pour l'extraction des protéines est adaptée de celle décrite par Görg *et al* [Görg, 1997]. L'épiderme humain provenant de plastie mammaire et séparé mécaniquement du derme au scalpel, est tout d'abord broyé dans l'azote liquide. La poudre obtenue est mise en suspension une solution d'acétone, TCA (Acide trichloracétique) 10%, DTT 0,12%. Les tubes sont ensuite placés une nuit à -20°C (pour éviter la dénaturation des protéines par les solvants organiques) puis centrifugés à 15000 g durant 30 min à 4°C. Les culots sont resuspendus dans une solution d'acétone, DTT 0,2% et placés 1 heure à -20°C. Les essais sont centrifugés 30 min à 15000 g (4°C) puis les culots sont séchés jusqu'à une déshydratation complète. Les culots sont ensuite resuspendus dans une solution de lyse : urée 9 M, CHAPS (ou 3-[(3-chlolamido-propyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) 2%, DTT 1% et la suspension est incubée 1 h à température ambiante. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma) est alors ajouté aux essais qui subissent ensuite un traitement aux ultrasons. L'étape finale de la préparation de l'extrait protéique consiste en une centrifugation à 15000 g durant 20 minute (4°C).

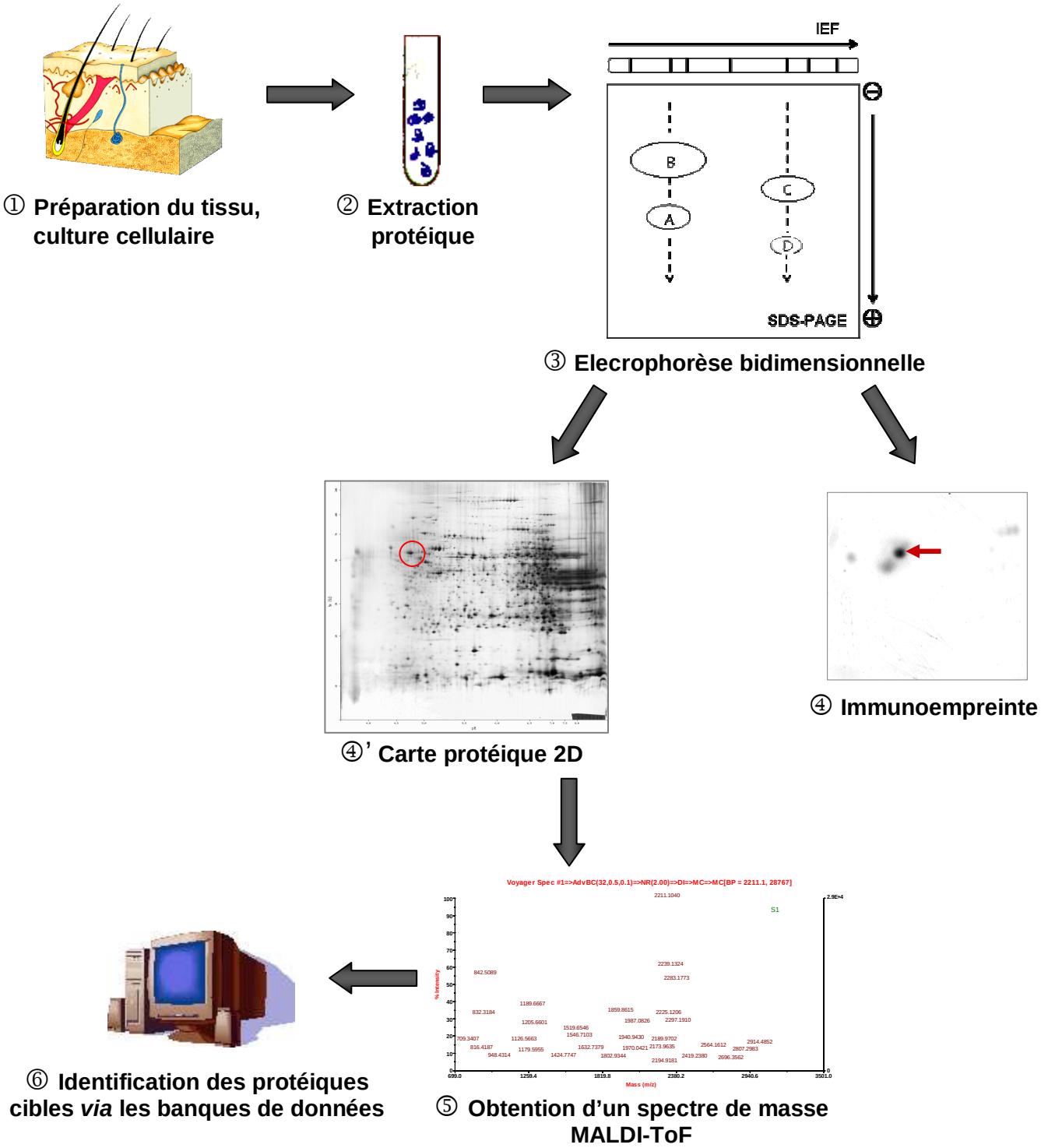


Figure 37. Représentation schématique des principales étapes de l'identification de protéines cibles d'anticorps par immunocriblage de carte protéique 2D couplé à la spectrométrie de masse. Les tissus sont préparés ou les cellules cultivées (1). Les protéines sont extraites (2) et séparées par une électrophorèse bidimensionnelle (3). Les protéines sont transférées sur une membrane avec laquelle, une immunoempreinte est exécutée en utilisant l'Ac d'intérêt (4). La protéine immunoréactive est repérée sur le gel bidimensionnel coloré au bleu de Coomassie (Carte protéique 2D) (4'), excisée de la carte protéique 2D et digérée par la trypsine. Un spectre de masse est obtenu après analyses des peptides générés lors de la digestion trypsique par spectrométrie de masse MALDI-ToF (5). La comparaison de ce spectre avec ceux des protéines répertoriées dans les bases de données permet l'identification univoque de la protéine d'intérêt (6).

Au cours de la mise au point d'une carte protéique 2D d'épiderme humain comportant des protéines de haut poids moléculaire, une seconde procédure d'extraction protéique adaptée de celle décrite par Rabilloud et Chevallet [Rabilloud et Chevallet, 2000] a été employée. Dans ce cas, les culots tissulaires séchés sont repris dans 1 volume de Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, sucrose 0,25 mM et 4 volumes d'urée 9,6 M, CHAPS 5%, spermine 25 mM, DTT 50 mM. La suspension est ensuite 1 h à température ambiante en présence d'inhibiteurs de protéases et ultracentrifugée à 250 000 g pendant 1 h à 4°C.

Pour les 2 procédures, les surnageants prélevés sont utilisés directement ou aliquotés et conservés à -80°C en vue d'une utilisation ultérieure pour la réhydratation des bandelettes à gradient de pH immobilisé (GPI).

Réhydratation des bandelettes GPI

Des bandelettes ReadyStrip™ de gel de polyacrylamide de 11 cm à gradient de pH préformé (pH 3-10) non linéaire (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) sont utilisées. Ces bandelettes subissent en premier lieu, une réhydratation passive pendant une nuit à température ambiante. Cette étape se déroule de la manière suivante : l'échantillon protéique (60 µl, issu de la méthode de Görg *et al*) est ajusté à un volume de 190 µl avec la solution de réhydratation : solution de lyse contenant du bleu de Bromophénol et des ampholytes (Bio-Lyte 3-10 ampholyte, Bio-Rad). Alternativement, la réhydratation des bandelettes GPI avant l'insertion active des protéines durant la première dimension qui est décrite ci-dessous est réalisée dans 200 µl de solution de réhydratation sans extrait protéique. Dans les 2 cas, la solution est déposée uniformément sur un portoir de réhydratation, dans une tranchée ajustée aux dimensions de la bandelette. La bandelette de gel est alors appliquée sur cette solution protéique et le couvercle du portoir refermé.

Première dimension : Isoélectrofocalisation des protéines

Les protéines sont tout d'abord séparées selon leur point isoélectrique (pI) par une étape d'isoélectrofocalisation (IEF). Les bandelettes GPI réhydratées avec l'extrait protéique sont transférées dans les rainures d'un plateau de focalisation, en contact avec les 2 électrodes (préalablement recouvertes de papier buvard humide) puis recouvertes d'huile minérale. Le plateau de focalisation est ensuite placé dans l'appareil Protean® IEF cell system (Bio-Rad) pour subir l'étape d'IEF. La migration électrophorètique s'effectue à 35000 V/h avec un voltage maximal de 8000 V à atteindre.

Pour la mise au point d'une carte protéique 2D d'épiderme humain comportant des protéines de haut poids moléculaire, les protéines sont activement insérées dans le gel GPI de la manière suivante : 90 µl d'échantillon protéique (issu de l'extraction adaptée de

Rabilloud et Chevallet) sont appliqués à l'extrémité basique du gel GPI (à proximité de la cathode) ou à l'extrémité acide du gel (à proximité de la anode) à l'aide du système cup loading tray for the Protean® IEF cell system (Bio-Rad) selon les instructions du fournisseur. Les bandelettes GPI placées dans le plateau de réhydratation sont ensuite recouvertes d'huile minérale et transférées dans l'appareil Protean® IEF cell system (Bio-Rad). L'étape de migration électrophorètique s'effectue durant 20 h à 6000 V.

A la fin de la première dimension, les bandelettes peuvent être immédiatement utilisées pour la deuxième dimension ou conservées à -20°C durant plusieurs semaines.

Equilibrage des bandelettes GPI

L'équilibrage est une étape fondamentale permettant aux protéines de sortir du gel de première dimension et de s'insérer dans celui de la deuxième dimension. Elle permet de solubiliser à nouveau les protéines, de réduire les ponts disulfures, de bloquer les fonctions SH libres et, enfin, de saturer uniformément les protéines en charges négatives. L'équilibrage des bandelettes est réalisé en les incubant successivement dans 2 solutions préparées extemporanément (Tableau 38).

Tableau 38. Composition des solutions de réhydratation des bandelettes GPI

	Solution 1	**Solution 2**
Urée	3,6 g	3,6 g
Tris 1,34 M pH 6,8	0,37 ml	0,37 ml
SDS	0,2 g	0,2 g
Glycérol	3 ml	3 ml
DTT	0,2 g	
Iodoacétamide		0,25 g
Bleu de Bromophénol 10%		30 µl
Eau bidistillée	Qsp 10 ml	Qsp 10 ml
Temps d'incubation	20 min	30 min

Deuxième dimension : Séparation des protéines par SDS-PAGE

Une fois l'équilibrage des bandelettes effectué, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par migration électrophorètique SDS-PAGE. Pour cette étape, des gels de polyacrylamide de 2 types sont utilisés : des gels commerciaux précoulés Criterion™ XT à gradient de porosité 3-8% (Bio-Rad Laboratories) ou des gels de porosité constante 14% (11 cm x 8 cm x 1 mm) (Tableau 33). Une solution d'agarose (0,5% d'agarose SeaPlaque® (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) dans du tampon de migration contenant 0,1% de SDS) fraîchement préparée et chauffée à 80°C est coulé au

dessus du gel, les bandelettes préalablement équilibrées y sont ensuite insérées jusqu'au bord supérieur du gel. Après gélification de l'agarose, les gels sont placés dans la cuve de seconde dimension, Criterion® Dodeca™ Cell system (Bio-Rad) puis recouverts de tampon de migration. La migration électrophorètique des protéines s'opère à un voltage de 120 V durant 2 h. Cette étape achevée, les gels sont soit colorés au bleu de Coomassie G-250 pour obtenir des cartes protéiques 2D, soit transférés sur une membrane de nitrocellulose en vue d'une immunoempreinte.

Coloration des protéines de la carte 2D

Pour être colorés au bleu de Coomassie, les gels sont incubés une nuit sous agitation dans une solution d'éthanol 50%, acide orthophosphorique (20 g/l) puis rincés 3 fois 30 min avec de l'eau bidistillée. Les gels sont ensuite incubés 1 h dans une solution de méthanol 34%, sulfate d'ammonium (170 g/l), acide orthophosphorique (20 g/l) puis 3 à 4 jours dans cette même solution mais contenant du bleu de Coomassie G-250 à 0,67 g/l (Sigma). Enfin, les gels rincés avec de l'eau bidistillée sont numérisés à l'aide d'un scanner (UMAX technologies Inc., Dallas, TX) et l'image acquise est transférée sur le logiciel Phoretix™ 2D (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle upon Tyne, UK) afin de repérer et d'annoter chaque tache protéique d'intérêt en vue de leur identification ultérieure.

Identification des protéines

Immunoempreinte à fluorescence infrarouge

L'immunoempreinte à fluorescence infrarouge est basée sur la révélation d'une immunoempreinte par la détection infrarouge simultanée de 2 longueurs d'onde émises par 2 molécules fluorescentes (2 couleurs) couplées chacune à des Ac secondaires dirigés contre les IgG de 2 espèces animales différentes. Ce procédé, plus sensible que la chimioluminescence, permet l'utilisation simultanée de 2 sondes Ac d'espèce différentes pour la détection d'une même cible protéique. Lorsque qu'une protéine est reconnue par les 2 Ac, la surimposition des 2 signaux fluorescents (vert et rouge) donne un marquage jaune.

Les protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle sont transférées sur une membrane de nitrocellulose comme précédemment décrit. La membrane est saturée dans du tampon TBS-T, lait 5% durant 2 h sous agitation. Après un lavage avec du tampon TBS-T, elles sont simultanément incubées 2 h avec soit les sérums (1 : 50) de souris et de lapin immunisés avec les peptides de l'isoforme tronquée de la Dsg1, soit avec les Acm isolés des souris immunisées avec la protéine rEC1/5-Dsg1 (1 : 100) et le sérum d'un patient atteint de PPN (1 : 200). Après 4 lavages, les membranes sont incubées 1 h simultanément soit avec des Ac de chèvre anti-IgG humaines couplés à la biotine (1 :

20000) (Caltag Laboratories) et des Ac de lapin anti-IgG de souris couplés à l'Alexa Fluor® 680 (1 : 6000) (Molecular Probes, Eugene, OR), soit avec des Ac de chèvre anti-IgG de lapin (1 : 2000) et des Ac de chèvre anti-IgG de souris couplés à l'Alexa Fluor® 680. Après 4 lavages, les membranes sont incubées 1 h avec de la streptavidine couplée à l'IRDye 800 (1 : 6000) (Rockland, Gilbertsville, PA). La réaction est révélée, après lavages de la membrane, à l'aide du scanner Odyssey™ Infrared Imaging (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Excision du gel et digestion trypsique des protéines

L'excision des taches protéiques du gel est réalisée grâce à l'utilisation de l'automate Ettan Spot Picker (Amersham Biosciences) piloté informatiquement par le logiciel Phoretix™ 2D (Nonlinear Dynamics Ltd). Après l'excision, l'automate dépose les morceaux de gel contenant la protéine d'intérêt dans le puit d'une plaque 96 puits (Costar) qui est ensuite transférée dans l'appareil de digestion Ettan Digester (Amersham Biosciences). Cet automate piloté informatiquement va combiner les étapes de lavages et de séchage du fragment de gel ainsi que la digestion trypsique de la protéine qu'il contient. Cette étape va permettre l'extraction du fragment de gel, des peptides issus de la digestion en vue de leur identification par spectrométrie de masse. Le protocole de digestion comprend : (i) 3 cycles de lavage du morceau de gel excisé de 30 min avec une solution de méthanol 50%, bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) 50 mM puis 2 cycles de 20 min avec de l'acétonitrile; (ii) un séchage du morceau de gel de 40 min; (iii) la digestion trypsique en utilisant une solution de trypsine seule (qui clive les protéines après les aminoacides basiques, lysine et arginine) (Trypsine (Sigma), TCA 0,01%, NH_4HCO_3 50 mM, acétonitrile 9%) durant 2 h puis associée à une solution de NH_4HCO_3 50 mM pendant 4 h; (iv) le transfert de chacune des solutions peptidiques au sein d'une nouvelle plaque 96 puits et leur incubation avec une solution d'acétonitrile 50%, TCA 0,1% pendant 20 min ; (v) le séchage précèdant l'analyse des peptides par spectrométrie de masse.

Spectrométrie de masse MALDI-ToF et identification des protéines

A la suite de la digestion trypsique, les peptides sont réhydratés dans une solution d'acétonitrile 50%, TCA 0,1%, puis mélangés à volume égal avec la matrice (composé d'acide 7.5 mg/ml α-cyano-4-hydroxy cinnamique à 7.5 mg/ml (LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France) saturée avec une solution d'acétonitrile 50%, TCA 0,1%) et immédiatement appliqués sur la cible MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*). Les échantillons sont analysés par un spectromètre de masse de MALDI-ToF Voyager-DE™ PRO (Applied Biosystems) en mode *reflector*. Cet

appareil ionise les fragments peptidiques et calcule leur masse par leur « temps de vol » après accélération dans un champ magnétique. L'analyse est obtenue sous forme d'un spectre composé de pics correspond au rapport masse/charge (m/z) de chacun des ions générés. La calibration externe de l'appareil est effectuée avec le Proteomix-Peptide calibration Mix4 (LaserBio Labs). Les spectres sont accumulés manuellement à partir de différentes acquisitions pour améliorer le *ratio* signal/bruit de fond. La comparaison de ces spectres expérimentaux avec les spectres virtuels de protéines enregistrés dans les bases de données (Swiss-Prot) accessibles sur Internet à l'aide d'un programme (Aldente, serveur Expasy) permet l'identification de la protéine d'intérêt. L'identification des protéines cibles est réalisée en triplicate.

2/ IMMUNOCRIBLAGE DE BANQUE D'EXPRESSION D'ADNc DE KERATINOCYTES HUMAINS (Figure 38)

L'immunocriblage est réalisé sur la banque d'expression d'ADNc de kératinocytes λgt11 (Clontech laboratories, Palo Alto, CA). Pour effectuer ce criblage, il est nécessaire d'obtenir une concentration optimale de plages de lyse (pfu) et donc de connaître le titre de la banque primaire. Celui-ci, déterminé par étalement de différentes dilutions, est de 10^{10} pfu/ml. Afin d'obtenir une concentration appropriée de pfu (environ 50000 pour 100 cm^2), les phages sont dilués (au 1 : 2500000) dans du milieu de dilution des phages. Pour étaler les plages de lyses, la souche bactérienne Y 1050^- (*E. coli*) est infectée avec les phages de la banque d'expression λgt11. Les plages de lyse sont dénombrées dans les boîtes de culture après 4 h d'incubation à 42°C. La bactérie synthétise les polypeptides codés par l'ADN du phage puis le phage lyse son hôte et infecte les bactéries voisines. Des membranes de nitrocellulose Hybond™-C extra (Amersham pharmacia biotech), préalablement incubées dans une solution à 10 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Euromedex, Mundolsheim, France), sont déposées sur le milieu de culture. L'expression protéique, sous le contrôle du promoteur du gène de la β-Galactosidase, est alors induite par l'IPTG lors d'une seconde incubation de 4 h à 37°C durant laquelle les polypeptides synthétisés se fixent sur les filtres de nitrocellulose. Après un lavage (PBS-T), les filtres sont saturés une nuit à 4°C avec une solution de PBS-T, 5% lait et subissent une analyse par immunoempreinte avec l'Acm à tester (1 : 100) en utilisant des Ac de chèvre anti-IgG de souris couplés à la peroxydase suivie d'une révélation par chimioluminescence.

Les ADNc des clones exprimant les peptides immunoréactifs sont amplifiés directement à partir de la colonie bactérienne par PCR en utilisant le couple d'amorces, 5´-GAC TCC TGG AGC CCG-3´; 3´-CGC GGC CAG CGA TGG-5´ (Eurogentec, Seraing, Belgium), spécifiques des séquences qui bordent le site de clonage *Eco*RI (Tableau 39 et

40). Les produits de PCR sont purifiés et séquencés à l'aide de ces mêmes amorces selon la méthode précédemment décrite.

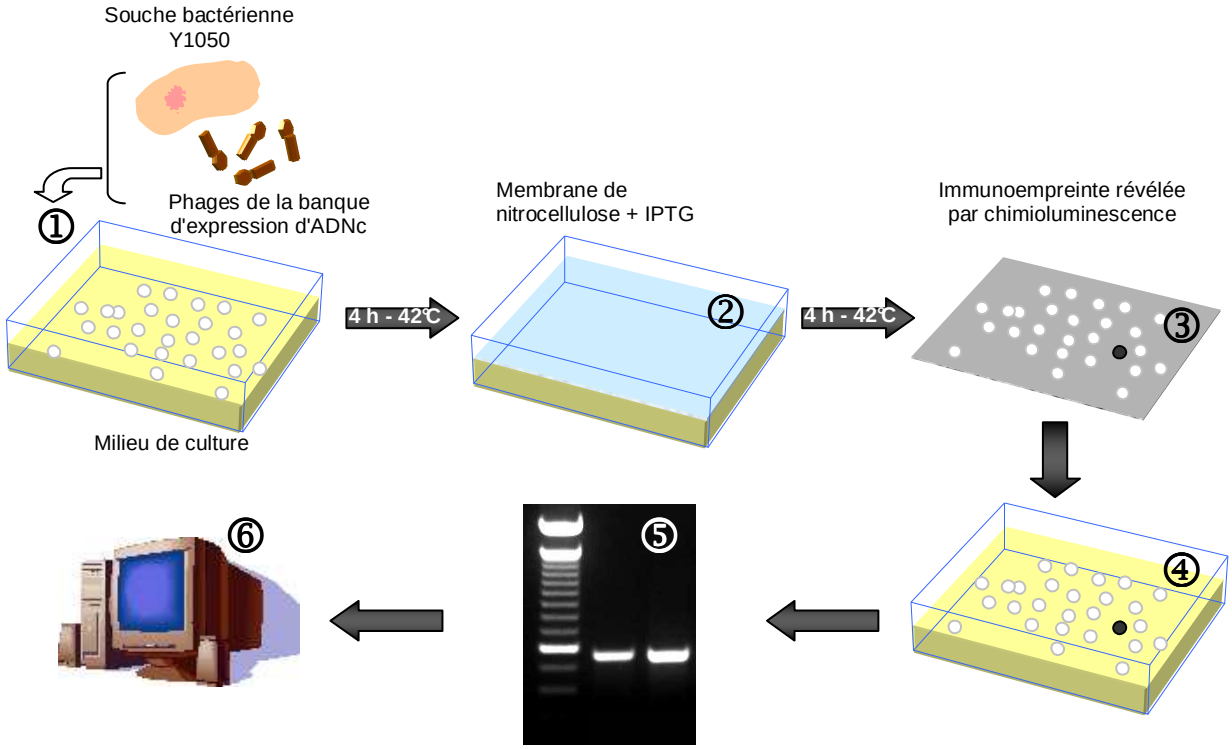


Figure 38. Représentation schématique des principales étapes de l'identification de protéines cibles d'anticorps par immunocriblage de banque d'expression d'ADNc. Les bactéries infectées par les phages de la banque sont cultivées 4 h à 42°C (1). L'expression protéique est induite par le dépôt sur le milieu de culture, d'une membrane de nitrocellulose imprégnée par une solution d'IPTG (2). Après 4 h de culture à 42°C, les peptides synthétisés sont transférés sur la membrane qui est lavée puis utilisée en immunoempreinte avec l'Ac d'intérêt (3). Le clone de la banque exprimant la protéine immunoréactive est prélevé afin d'être isolé et amplifié (4). L'ADNc exprimé par ce clone est amplifié par PCR à l'aide d'amorces bordant le site de clonage du phage (5). Les produits de PCR sont ensuite purifiés et séquencés. Les séquences sont comparées aux banques de données disponibles sur Internet permettant l'identification de la cible protéique de l'Ac d'intérêt (6).

Tableau 39. Composition du mélange réactionnel de la PCR de criblage des clones de la banque λgt11

Réactifs	Volumes
Matrice ADNc	Inoculum bactérien
Mélange des 4 dNTPs (40 mM chacun)	0,75 µl
Tampon de la *Taq*DNA Polymérase	5 µl
Amorces 5´GT11 (100 pmol/µl) + 3´T11Neu (100 pmol/µl)	1 µl + 1 µl
*Taq*DNA Polymérase DyNazyme™ EXT (Finnymes Oy)	0,25 µl
H_2O	q.s.p. 50 µl

Tableau 40. Phases de la réaction de PCR de criblage des clones de la banque λgt11

Phases	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	5 min	94 °C	1
Dénaturation	1 min	94 °C	
Hybridation	1 min 30	54 °C	30
Elongation	3 min	72 °C	
Elongation finale	10 min	72 °C	1

F- L'étude fonctionnelle de peptides spécifiques de l'isoforme tronquée de la desmogléine 1

1/ CAPACITE DE LIAISON DES PEPTIDES AUX MOLECULES HLA DE CLASSE II

Pour cette étude, 4 peptides spécifiques de l'isoforme tronquée de la Dsg1 ont été synthétisés, purifiés (pureté >99%) et contrôlés par spectrométrie de masse (INSERM U413, IFRMP23, Mont Saint Aignan, France). Ces peptides de 20 aminoacides, chevauchent le domaine EC2 et la séquence peptidique INT6 de l'isoforme tronquée de la Dsg1 : EC2/INT6 211-230 (INRNTGEIRTMNNFLDREIY) ; EC2/INT6 216-235 (GEIRTMNNFLDREIYVNVEP) ; EC2/INT6 221-240 (MNNFLDREIYNVEPTFQRT); EC2/INT6 226-245 (DREIYVNVEPTFQRTLHKTK). La capacité de ces peptides de se fixer aux molécules HLA de classe II : DRB1*0101, *0401, *0102 et *0402 a été étudiée par une technique d'ELISA compétition (Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, France) précédemment décrite (Texier, 2000 ; Texier, 2001). Brièvement, les molécules HLA de classe II sont immunopurifiées par chromatographie d'affinité à l'aide de l'Ac monomorphe L243 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) couplé à de la protéine A sépharose à partir d'un lysat de lignées cellulaires HOM-2 (DRB1*0101), BOLETH (DRB1*0401), MZ07 (DRB1*0102) et YAR (DRB1*0402). Les peptides d'intérêt, dilués en série, sont incubés 24 à 72 h avec des peptides compétiteurs biotinylés (d'affinité optimale pour ces molécules HLA-DR) et les molécules HLA-DR purifiées à tester dans un tampon à pH 6 (10 mM phosphate, 150 mM NaCl, 10 mM citrate, 0,003% thimerosal). Ces peptides compétiteurs sont le peptide HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT) pour les molécules DRB1*0101 (1 nM) et DRB1*0401 (30 nM) et le peptide ALK (AALAAAKAAAAAA) pour les molécules DRB1*0102 (10 nM) et DRB1*0402 (10 nM). Après neutralisation, les mélanges (100 µl) sont incubés 2 h à température ambiante dans les puits de plaque ELISA Maxisorp® (Nalge nunc

internationnal) recouverts par l'anticorps L243 (10 µg/ml). Après lavages, la présence de peptides biotinylés est révélée par la fluorescence émise et détectée à 450 nm (Fluorite 1000 fluorometer, Dynex, Issy les moulineaux, France) conséquence de l'addition d'un conjugué streptavidine couplé à la phosphatase alcaline et du substrat 4-methylumbelliferyl phosphate. La fixation maximale est déterminée par l'incubation des peptides compétiteurs avec les molécules HLA-DR purifiées en absence des peptides de la forme tronquée de la Dsg1. Les expériences sont réalisées en triplicate et les données sont exprimées comme la concentration de peptide d'intérêt qui prévient la fixation de 50% du peptide compétiteur (IC_{50}).

2/ PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE

Les PBMC humaines de patients atteints de PF (n=8), de PV (n=13) et de pemphigoïde bulleuse (n=6) sont isolés par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Après 3 lavages au PBS, les cellules sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez, après coloration au bleu de Trypan (Gibco BRL). Les cellules sont ensuite ramenées à la concentration de 10^6 cellules par ml de milieu RPMI 1640 (Cambrex Bio Science) supplémenté par 10% de plasma autologue décomplémenté (56°C, 30 min) et mises en culture en triplicate sur une plaque (96 puits) Nunclon™ (Nalge nunc international) à raison de 200 µl par puits (soit 2.10^5 cellules). Les cellules sont stimulées par l'adjonction des peptides EC2/INT6 216-235 ou EC2/INT6 226-245 (20 µg/ml). Après l'addition des différents peptides à la culture cellulaire, les plaques sont placées à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO^2 pendant 6 jours. Un contrôle négatif de stimulation correspond à la mesure de la stimulation de la prolifération spontanée des cellules, sans adjonction de peptides et les contrôles positifs de stimulation, à la mesure de prolifération cellulaire induite par la phytohémagglutinine (PHA) (Sigma) à 5 µg/ml.

La prolifération cellulaire est quantifiée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (Amersham Biosciences). Un µCi de thymidine tritiée est ajouté dans chaque puits 18 h avant la récolte des cellules. La récolte s'effectue sur un filtre (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) à l'aide d'un récolteur de cellules (Perkin Elmer Applied Biosystems). Chaque filtre est placé dans un film plastique contenant du liquide scintillant (Wallac Inc.) qui est par la suite refermé et placé dans une cassette. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur β (Wallac Inc.). Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm). Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre les différents patients, ceux-ci sont exprimés en index de stimulation (SI, *stimulation index*). La médiane des proliférations induites par les peptides antigéniques est rapportée à celle des proliférations spontanées. Un SI supérieur ou égal à 2 est considéré comme positif.

RESULTATS

RESULTATS

A- Un épitope T spécifique d'une isoforme tronquée de la desmogléine 1, générée par épissage alternatif, se fixe à la molécule HLA DRβ1*0102 de susceptibilité au pemphigus superficiel

Afin de produire la région EC complète de la Dsg1, nous avons séquencé un fragment d'ADNc obtenu successivement par reverse transcription d'ARNm extraits de kératinocytes humains en utilisant une amorce oligo-dT et amplification par PCR à l'aide d'amorces localisées respectivement aux extrémités 5´ et 3´ des séquences codantes pour les domaines EC1 et EC5 de la protéine [Mouquet, 2006]. De façon surprenante, nous avons identifié des transcrits alternatifs de la Dsg1 caractérisés par une insertion intronique de 101 pb correspondante à l'extrémité 3´ de l'intron 6 du gène *DSG1* et localisée entre les exons 6 et 7 qui codent avec l'exon 5 pour le domaine EC2 de la protéine (Figure 39). Cette insertion comporte un codon stop qui pourrait conduire à l'arrêt de la traduction et donc à la production d'une isoforme tronquée de la Dsg1. Dans cette éventualité, cette isoforme serait constituée du domaine EC1, de la séquence 158-227 du domaine EC2 de la Dsg1 et d'un peptide supplémentaire à l'extrémité C-terminale (INT6 ; 17 aminoacides) codé par l'insertion intronique et absent de la forme transmembranaire de la Dsg1.

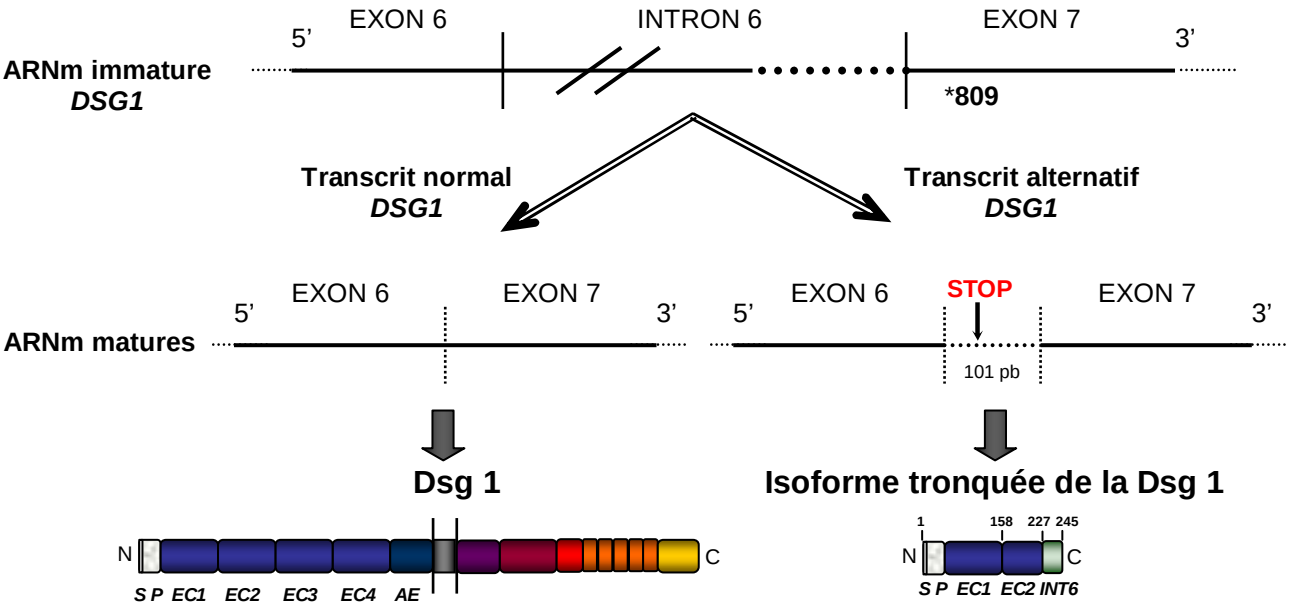


Figure 39. Epissage alternatif à l'origine d'une isoforme tronquée de la Dsg1. Les transcrits alternatifs de la Dsg1 sont caractérisés par une insertion intronique de 101 pb correspondante à l'extrémité 3´ de l'intron 6 du gène *DSG1* et localisée entre les exons 6 et 7 qui codent avec l'exon 5 pour le domaine EC2 de la protéine. Cette insertion comporte un codon stop qui pourrait conduire à l'arrêt de la traduction et donc, à la production d'une isoforme tronquée de la Dsg1. Dans l'éventualité de sa synthèse, cette isoforme serait constituée du domaine EC1, de la séquence 158-227 du domaine EC2 de la Dsg1 et d'un peptide supplémentaire à l'extrémité C-ter (INT6 ; 17 aminoacides) codé par l'insertion intronique et absent de la forme transmembranaire de la Dsg1.

L'existence de ces ARNm *DSG1* alternatifs dans l'épiderme humain a été confirmée par PCR *via* l'amplification d'une séquence d'ADNc spécifiques de ces transcrits ceci pour l'ensemble des donneurs sains testés (n=9). Les analyses en PCR quantitative montrent que ces transcrits alternatifs représentent en moyenne 15% (variation interindividuelle de 6 à 30%) de la totalité des ARNm *DSG1* (normaux et alternatifs).

Afin de confirmer l'expression de cette isoforme tronquée de la Dsg1 (poids moléculaire théorique de 22,4 kDa) dans l'épiderme humain, des antisérums dirigés contre les peptides EC2(184-194) (commun à la Dsg1 et à son isoforme tronquée) et INT6 (uniquement présent sur l'isoforme de la Dsg1) ont été produits et caractérisés. En immunoempreinte, ces Ac polyclonaux qui reconnaissent l'isoforme tronquée recombinante, réagissent également avec des protéines présentes dans un extrait d'épiderme humain. Plus précisément, l'Ac anti-EC2(184-194) reconnaît un doublet protéique de 25 kDa et les Ac anti-INT6 (n=4), une protéine unique de 25 kDa. Néanmoins, les expériences de comarquage par immunoempreinte infrarouge montrent qu'une seule et même bande protéique de 25 kDa est reconnue par les Ac anti-EC2(184-194) et anti-INT6. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par immunoempreinte infrarouge sur une carte protéique 2D d'épiderme humain. En effet, les 2 Ac anti-isoforme tronquée de la Dsg1 réagissent avec une protéine unique ayant les coordonnées de poids moléculaire et de pI attendus. De plus, cette protéine de 25 kDa qui est détectée par immunoempreinte dans un extrait de kératinocytes en culture primaire, n'est pas exprimée dans d'autres tissus épithéliaux tels que le rein et l'intestin grêle. Enfin, les Ac anti-INT6 donnent un marquage fluorescent des kératinocytes des couches basales de l'épiderme en IFI sur coupes de peau humaine.

Une récente étude *in silico* a montré que les séquences spécifiques d'isoformes protéiques générées par épissage alternatif pouvaient constituer des épitopes cibles de la réponse lymphocytaire T restreinte par des molécules HLA de classe I et II. De plus, l'existence d'une réponse auto-immune T dirigée contre des épitopes spécifiques d'isoformes de l'autoAg MBP a été démontrée dans la SEP. Nous avons donc en premier lieu évalué la capacité de 4 peptides spécifiques de l'isoforme tronquée de la Dsg1 à se fixer aux molécules HLA DRB1*0101, *0102 et *0402, précédemment décrites comme allèles de susceptibilité au PS. Ces analyses réalisées par compétition dans un test ELISA utilisant des peptides « traceur » d'affinité optimale pour différentes molécules HLA, montrent que seul le peptide EC2/INT6 216-235 se fixe avec une forte affinité aux molécules HLA testées, en particulier à la molécule DRB1*0102. Nous avons ensuite évalué la capacité de ce peptide EC2/INT6 216-235 à induire la prolifération de PBMC isolées chez les patients atteints de PF et de PV. Nos résultats montrent que les PBMC prolifèrent en réponse à ce peptide de l'isoforme tronquée de la Dsg1 chez 50% des

patients atteints de PF (n=7) et 7,7% des patients atteints de PV (n=14), contrairement à ceux isolés des patients atteints de pemphigoïde bulleuse (n=6). Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *The Journal of Immunology*.

ARTICLE 1

A Truncated Alternative Spliced Isoform of Human Desmoglein 1 Contains a Specific T-Cell Epitope Binding to the Pemphigus Foliaceus-Associated HLA Class II DRβ1*0102 Molecule.

H. Mouquet, S. Farci, P. Joly, L. Drouot, J. Leblond, J. Leprince, M. C. Tonon, P. Loiseau, D. Charron, B. Maillère, F. Tron, D. Gilbert.

J. Immunol. 2006:177;6517-26.

A Truncated Alternative Spliced Isoform of Human Desmoglein 1 Contains a Specific T Cell Epitope Binding to the Pemphigus Foliaceus-Associated HLA Class II DRβ1*0102 Molecule[1]

Hugo Mouquet,* Sandrine Farci,† Pascal Joly,* Bernard Maillère,† Jonathan Leblond,* Laurent Drouot,* Jérôme Leprince,‡ Marie Christine Tonon,‡ Pascale Loiseau,§ Dominique Charron,§ François Tron,[2]* and Danièle Gilbert*

Desmogleins (Dsg) are transmembrane glycoproteins of the desmosome that allow a cell-cell adhesion between keratinocytes and comprise four different isoforms (Dsg1 to Dsg4). Two Dsg are targeted by pathogenic autoantibodies produced in the course of autoimmune bullous skin diseases, Dsg1 in pemphigus foliaceus (PF), and Dsg3 and Dsg1 in pemphigus vulgaris. The genetic susceptibility to PF is associated with certain HLA class II alleles, which are thought to participate in disease pathogenesis through their capacity to accommodate autoantigen-derived peptides and present them to autoreactive T cells. So far, a unique isoform of Dsg1 has been described in humans, which includes several immunodominant T cell epitopes. In this study, we describe an alternative transcript of *DSG1*, which contains a 101-bp insertion corresponding to the 3′ end of *DSG1*-intron 6 and introducing a stop codon in the nucleotide sequence. This alternative transcript leads to the synthesis of a truncated isoform of Dsg1 expressed in normal human epidermis. This isoform bears a specific peptide sequence that binds to the PF-associated HLA class II DRβ1*0102 molecule as shown in a HLA-DR peptide-binding assay, and induces PF T cell proliferation. These data provide an illustration of an autoantigen encoded by alternative spliced transcript that may participate in the pathogenesis of the disease by bearing PF-associated HLA class II restricted-epitope. ***The Journal of Immunology,*** **2006, 177: 6517–6526.**

Alternative splicing of premessenger RNA is an important molecular mechanism allowing the cells to synthesize a large number of proteins from a limited number of genes (1). Indeed, whereas the human genome encodes between 30,000 and 60,000 genes, the human proteome consists of at least 9.10^4 proteins, suggesting, notably by bioinformatic analysis, that 42% of randomly selected gene transcripts undergo alternative splicing. Different varieties of splicing mechanisms have been described (1), which may lead to the synthesis of multiple isoforms from a single mRNA transcript.

Self-Ags play a major role in the occurrence of autoimmune diseases because they participate in both the initiation and maintenance of the autoimmune response and the development of lesional immune effectors (2). Several mechanisms have been proposed to explain why self proteins may become immunogenic (3). Among these, alternative splicing might operate through the production at the periphery of novel B or T epitopes to which lymphocytes have not been tolerized during their maturation in central lymphoid organs. The role of alternative spliced variants of protein self Ags in the breakage of immune tolerance has been demonstrated in several autoimmune diseases (4, 5).

Desmogleins (Dsg)[3] consist of four different desmosomal transmembrane glycoproteins belonging to the desmosomal cadherin family (Dsg1 to Dsg4), which are encoded by separate genes located within the 250-kb cadherin cluster of the 18q12.1 chromosome (6). Desmosomal cadherins comprise five extracellular (EC) domains, a transmembrane domain, and a cytoplasmic region containing five domains, and allow a calcium-dependent cell-cell adhesion critical for desmosomal junction. Dsg2 is detected in all desmosome-possessing tissues, whereas Dsg1 and Dsg3 are restricted to stratified squamous epithelia-like epidermis (7). Dsg1 is the autoantigen of pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune blistering skin disease characterized by an autoantibody response directed against conformational calcium-dependent epitopes of the Dsg1 EC domains, particularly the N-terminal adhesive region (EC1 and EC2 domains) (8–10). Anti-Dsg1 autoantibodies are pathogenic because, when transferred to normal mice, their in vivo binding to Dsg1 leads to a loss of adhesion between keratinocytes called acantholysis and the formation of intraepidermal blisters (11, 12). The tolerance breakdown against Dsg1 is not restricted to PF, because anti-Dsg1 Abs can also be found in other forms of pemphigus, including pemphigus vulgaris (PV) and paraneoplastic

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 519, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rouen, France; †Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, Commissariat à l'Energie Atomique-Saclay, Gif sur Yvette, France; ‡Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 413, Mont Saint Aignan, France; and §Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilite, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 396, Paris, France

Received for publication December 23, 2005. Accepted for publication August 7, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. H.M. is the recipient of a fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie.

[2] Address correspondence and reprint requests to Dr. François Tron, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 519, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 22 boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex 1, France. E-mail address: francois.tron@chu-rouen.fr

[3] Abbreviations used in this paper: Dsg, desmoglein; EC, extracellular; PF, pemphigus foliaceus; PV, pemphigus vulgaris; BP, bullous pemphigoid; BT, bovine thyroglobulin; IRF, infrared fluorescent; SI, stimulation index; pI, isoelectric point; MBP, myelin basic protein; NZ, New Zealand.

Copyright © 2006 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/06/$02.00

pemphigus (13, 14). The production of anti-Dsg1 Abs is dependent on Dsg1-specific Th lymphocytes, which exhibit a memory T cell phenotype and a Th2-like cytokine profile and are detected in PF patients (15). Like in most autoimmune diseases, HLA class II genes contribute to genetic susceptibility of PF, particularly DR1, DR4, and DR14. Several alleles of these haplotypes are associated with PF, including DRB1*0102, which has been found recurring in different studies (16–19), notably those involving French PF patients (17, 19). The major mechanism proposed to explain the association between MHC class II genes and autoimmune diseases is that disease-associated alleles can efficiently accommodate autoantigen-derived peptides initiating and sustaining the autoreactive T cell response. Thus, in PF, a major objective is to identify T cell epitope peptides of Dsg1 that could initiate the autoimmune response (15).

In this study, we describe alternative transcript of *DSG1* gene (*DSG1*-AT) containing an intronic insertion of 101 bp in normal human skin. This insertion introduces a stop codon that leads to the synthesis of a truncated isoform of Dsg1 carrying amino acid sequences encoded by intronic sequences and absent from the native Dsg1. This Dsg1-truncated isoform was shown to be expressed in normal human epidermis and to bear a specific peptide sequence binding to the PF-associated DRB1*0102 molecule and inducing a T cell response in PF patients.

Materials and Methods

Patients

Peripheral blood was obtained from 21 adult patients with PF ($n = 8$) or PV ($n = 13$) as well as from 6 patients with bullous pemphigoid (BP) (Table I), who were seen in Dermatology Departments of the French Bul-

Table I. *Clinical phenotype, HLA DRβ1 alleles, and autoantibody profile of PF and PV patients*

Patient	Sex/Age	HLA DRβ1	Clinical Status[a]	Clinical Phenotype[b]		Medication (per day)[c]	Autoantibody Profile (IgG)[d]	
				Skin	Mucosa		Anti-Dsg1	Anti-Dsg3
PF1	M/73	0102, 1302	Remission	None	None	3 mg PDN	-	-
PF2	F/48	0101, 1601	Acute onset	Extensive erosions on the trunk	None	0.05% CP	165	-
PF3	F/50	11, 14	Remission	None	None	5 mg PDN, 15 mg MTX/ week	-	-
PF4	F/60	0402, 08	Remission	None	None	7 mg PDN	36	-
PF5	F/39	13, 14	Remission	None	None	100 mg AZA	-	-
PF6	F/63	0101, 16	Remission	None	None	8 mg PDN	202	-
PF7	F/52	0102, 04	Chronic active	Erythematous and squamous erosions	None	ND	-	-
PF8	M/73	12, 13	Acute onset	Chronic prurit	None	None	-	-
PV1*	M/77	03, 11	Acute onset	Crusty erosions of the face, scalp and neck	Extensive oral erosions and crusty erosions of the lips	None	55	132
PV2*	M/82	0402, 0404	Acute onset	Crusty erosions of the face	Erosions of the palate, buccal mucosa and nostrils	None	22	154
PV3*	M/70	0408, 14	Remission	None	None	14 mg PDN	-	60
PV4*	M/26	0402, 08	Remission	None	None	10 mg PDN	-	211
PV5*	F/50	0402, 14	Remission	None	None	7 mg PDN	-	175
PV6	F/28	08, 15	Acute onset	None	Erosions of the oral cavity, oropharynx, larynx and trachea	None	-	104
PV7	F/47	08, 13	Chronic active	None	Pharyngeal lesions	16 mg PDN	-	76
PV8*	F/78	0402, 11	Chronic active	Erosion of the left inferior eyelid	Erosions of the buccal mucosa, gingiva and nostril	25 mg MTX/ week, 0.03% tacrolimus	-	90
PV9*	M/32	0402, 13	Chronic active	Erosions of the scalp	Buccal erosions	70 mg PDN	-	36
PV10	F/79	07, 1404	Chronic active	None	Erosions of the palate and buccal mucosa	0.5 mg PDN/kg	-	120
PV11	M/74	0402, 13	Remission	None	None	8 mg PDN, 2 g MPM	-	-
PV12*	M/41	0402, 13	Chronic active	Erosions on the trunk	Labial/gingival erosion	100 mg AZA, 7 mg PDN	-	154
PV13*	F/13	0402, 0402	Chronic active	Erythematous eruption	Lesions of the oral cavity	1 mg PDN/ kg	-	51

[a] As defined in *Materials and Methods.*
[b] At the time of the study.
[c] AZA, azathioprine; CP, clobetasol propionate; MPM, mycophenolate mofetil; PDN, prednisone;
[d] Values are expressed in units per milliter of sera (U/ml). Values > 20 U/ml (anti-Dsg1) and 14 U/ml (anti-Dsg3) were considered significant (-, NS values).
* PV patients with a mucocutaneous clinical phenotype during an active phase of the disease.

lous Study Group. All patients gave written consent to participate in this study. Clinical diagnosis of PF, PV, and BP was confirmed by histopathology, direct immunofluorescence microscopy on perilesional skin, and serum analysis including indirect immunofluorescence microscopy on monkey esophagus (The Binding Site), or salt-split human foreskin sections, immunoblotting on human epidermis extract, and commercial ELISAs (Medical and Biological Laboratories), to detect circulating anti-Dsg1/3 and anti-BP180 autoantibodies in pemphigus and BP patients, respectively. Active-onset of the disease was defined as de novo development of blisters/erosions on skin and/or mucosa of untreated patients. Chronic active pemphigus was defined as incomplete remission or relapse in patients with immunosuppressive treatment. Clinical remission was defined as treated patients who had not experienced new cutaneous and/or mucosal lesions for ≥6 mo before the study.

HLA class II typing

Genomic DNA was extracted from whole blood (2 ml) of pemphigus patients using QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen) and used for HLA class II DRβ1 typing as described previously (19).

RT-PCR analysis

Mammary surgery specimens of normal skin were used as source of epidermis. Total RNA was extracted from nine human epidermis using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies). The cDNA was obtained by transcription of random-primed RNA by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies), and then subjected to PCR amplification (RT-PCR). Primers used to amplify specific gene products were as follows: *GAPDH* sense, 5′-TGC CAT CAA CGA CCC CTT CA-3′; *GAPDH* antisense, 5′-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3′; *DSG1* sense, 5′-AAT GGC TAC ATT TGC AGG ACA-3′; *DSG1* antisense, 5′-ATC TCG GTC AGA GCC TCT TAC A-3′; *DSG1*-AT sense, 5′-TAG ACA GAG AGA TTT ATG TAA ACG TTG-3′; *DSG1*-AT antisense, 5′-TAT TAC AGG CAA TAT CAC ACT TGA C-3′. PCR conditions for *GAPDH* comprised one cycle of 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final elongation step of 72°C for 4 min. For PCR of *DSG1* cDNA, conditions were identical except for the time of initial denaturation step and the annealing temperature, which were 4 min and 58°C, respectively. To amplify *DSG1*-AT cDNA, PCR conditions comprised 94°C for 4 min, 40 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final elongation step of 72°C for 4 min. All PCR were performed in a volume of 50 μl using an Eppendorf thermocycler, with 2.5 U of *Taq* polymerase (Promega). Amplification products (15 μl) were separated and visualized by ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel electrophoresis.

Quantitative real-time PCR analysis

The cDNA synthesis of the nine human epidermis samples is described above. Quantitative real-time PCR were performed using the LightCycler thermocycler system (Roche Molecular Biochemicals). Amplification reactions were conducted using the FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche) according to the manufacturer's instructions in a total volume of 20 μl in glass capillaries, containing 2 μl of cDNA sample, 2 μl of FastStart DNA Master SYBR Green I, 2 mM $MgCl_2$, and 10 pmol of each primer. PCR amplifications of *DSG1* and *DSG1*-AT cDNAs were conducted simultaneously and comprised one cycle of 94°C for 10 min, 50 cycles of 94°C for 20 s, 61°C for 10 s, and 72°C for 12 s. PCR conditions for *GAPDH* amplification comprised one cycle of 94°C for 10 min, 40 cycles of 94°C for 20 s, 62°C for 10 s, and 72°C for 22 s. At the end of amplification cycles, PCR products were subjected to melting temperature analysis in 3 steps: 1) 10 s for 94°C (20°C/s), 2) 30 s for 66°C (20°C/s), and 3) a slight temperature increase of 0.1°C/s until 94°C to generate fusion curves. Data acquisition and analysis were conducted using LightCycler 3.5 software.

To determine the absolute copy number of target transcripts, purified *GAPDH*, *DSG1*, and *DSG1*-AT cDNAs were used to generate calibration curves. cDNAs were amplified by classic PCR as described above, purified using the Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and quantified with both measure of the absorbance at 260 nm and comigration on a 1.5% agarose gel with the Mass Ruler DNA Ladder (MBI Fermentas). Conversion of micrograms to copy number was done using the following formula: n (copy) = $[(m \times 1515)/Nbp] \times 10^{-12} \times N$ (m: μg of dsDNA, Nbp: length of the amplicon in bp, N: the constant of Avogadro). Serial dilutions were used to create calibration curves by plotting the threshold cycle vs the known copy number of each purified amplimer in the dilutions (20, 21). PCR efficiency was calculated using calibration curves with the following formula: $e = 10^{-1/s}$ (s: slope) (with an efficiency equal of 2 ($s = -3.32$) that give an optimal value of 100%). For each human epidermis sample, calibrators spanning five dilution points, *GAPDH* or *DSG1* and AT-*DSG1* cDNAs, and nontemplate controls were amplified in triplicate, simultaneously in one LightCycler run. Following each run, amplification reactions and amplimer sizes were checked by ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel electrophoresis.

To correct for differences in both RNA quality and quantity between samples, data were normalized by dividing the copy number of *DSG1* or *DSG1*-AT cDNA by the copy number of *GAPDH* (22). Quantitative results are presented as copies of the target cDNA per 1000 copies of *GAPDH* (23, 24). Relative quantity of *DSG1*-alternative transcript was determined, dividing the absolute copy number of these mRNAs by those of the total Dsg1 mRNAs (normal and alternative).

Peptides

Six peptides of the Dsg1-truncated isoform were synthesized, purified by HPLC (with purity >99%), and controlled by mass spectrometry (Institut de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 413). Two peptides were used in the immunization protocol (see below): the INT6 peptide (IYVNVEPTFQRTLHKTK) encoded by the intron 6 insertion is specific to the Dsg1-truncated isoform; and the EC2 (184–193) peptide (ADEPNNLNSK) is present in both Dsg1 and Dsg1-truncated proteins, and was chosen on the basis of antigenicity, accessibility, and hydrophilicity criteria. Four overlapping 20-mer peptides between the EC2 domain and INT6 peptide of the Dsg1-truncated isoform, EC2/INT6 211–230 (INRNTGEIRTMNNFLDREIY), EC2/INT6 216–235 (GEIRTMNNFL DREIYVNVEP), EC2/INT6 221–240 (MNNFLDREIYNVEPTFQRT), and EC2/INT6 226–245 (DREIYVNVEPTFQRTLHKTK), were used in the HLA-DR peptide-binding assays.

Animals and immunization

New Zealand (NZ) White rabbits and CD1 mice were purchased from Charles River Laboratories. For animal immunization, EC2 (184–193) and INT6 synthetic peptides were coupled to bovine thyroglobulin (BT) using glutaraldehyde. Mice and rabbits were primed respectively with 40 μg (i.p.) and 200 μg (s.c.) of BT-coupled peptides emulsified in CFA and boosted eight times every 3 wk for 7 mo with BT-coupled peptides in IFA. IgG anti-EC2 (184–193) or anti-INT6 peptides were detected by ELISA using the corresponding peptide as Ags and immunoblotting of purified recombinant Dsg1-truncated isoform synthetized by in vitro transcription/translation (EC1/2-INT6).

Peptide ELISA

Ninety-six-well microtiter plates (Maxisorb Nunc) were coated with 100 μl of EC2 (184–193) or INT6 synthetic peptides (10 μg/ml), in PBS and incubated overnight at 4°C. After washing three times with PBS-0.1% Tween 20 (PBST), wells were blocked with PBS-1% Tween 20–5% sucrose-3% milk powder for 1 h at room temperature. After removal of excess blocking solution, mouse or rabbit sera (1/100 in PBST-1% BSA) were added and incubated 1 h at room temperature. After washing with PBST, the plates were incubated with 1/10,000-fold diluted biotin-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (Caltag Laboratories) for 1 h. After three washes, 1/10,000-fold diluted alcalin phosphatase-conjugated streptavidin (Caltag Laboratories) was added for 30 min at room temperature. The plates were washed, and labeling was revealed by adding 100 μl of *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich). OD were determined at 405 nm with an ELISA reader (Labosystems). All assays were run in duplicate, and background values given by each animal serum tested in uncoated wells were subtracted. To control the specificity of the assay, preimmune sera were included in each experiment.

Indirect immunofluorescence assay

Mouse and rabbit sera (1/50) were analyzed by indirect immunofluorescence on human foreskin sections using FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG Abs or FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG Abs (Sigma-Aldrich) as the tracer. Sections were examined using a fluorescence microscope (Zeiss).

In vitro transcription translation

The Dsg1-truncated isoform was obtained as a recombinant polypeptide, called EC1/2-INT6, using an in vitro transcription-translation system. cDNA coding for EC1/2-INT6 was prepared from human epidermis RNAs,

and was amplified with a specific pair of primers: 5′-GAA TGG ATC AAG TTC GCA GCA G-3′ (sense); 5′-TTA CTT TGT CTT ATG TAA AGT TCT TTG-3′ (antisense). The purified PCR product was cloned in-frame in the pSPUTK in vitro translation vector (Stratagene) at the *Apa*I and *Bam*HI restriction sites and sequenced with an automated sequencer (PerkinElmer Applied Biosystems), using the SP6 and T7 primers. Sequences were aligned and analyzed using the GenBank/EMBL databases (National Center for Biotechnology Information/Basic Local Alignment Search Tool network service). Then, 2 μg of plasmid preparation were used for in vitro expression in the TNT6 SP6 Quick Coupled Transcription-Translation System (Promega) according to the manufacturer's instructions. To obtain purified product, 2 μl of Transcend Biotin-Lysyl tRNA (Promega) were added to the reaction mixture, and the biotinylated polypeptides were captured by SoftLink Avidin Resin (Promega) and eluted with Laemmli solution. The production and purity of EC1/2-INT6 were controlled by SDS-PAGE analysis on a 14% separating gel followed by immunoblotting with a peroxidase-conjugated streptavidin (Promega).

Immunoblot analysis

Mammary surgery specimens of normal human skin were used as the source of epidermis. Protein extraction was performed as described previously (25). Total protein extracts (75 μg/well) of normal kidney and small intestine were also used as the other source of epidermal cells. Proteins were separated by SDS-PAGE with a 14% separating gel according to the Laemmli's method and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. The filters were then saturated for 1 h in TBS-0.05% Tween 20 (TBST) −5% dry milk, and incubated with rabbit or mouse sera (1/50) in TBST-5% dry milk for 2 h. After washing, filters were incubated for 1 h with 1/20,000-diluted peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG or 1/80,000-diluted peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) in TBST-5% dry milk. The filters were washed and revealed by chemiluminescence reaction (ECL Supersignal; Amersham Biosciences). For infrared fluorescent (IRF) immunoblot experiments performed with the Odyssey Infrared Imaging system, procedures were followed as described previously (26). Briefly, after a saturating step, the membranes were incubated simultaneously with rabbit anti-EC2 and mouse anti-INT6 sera (1/50) for 2 h, then the membranes were incubated simultaneously with biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (Caltag Laboratories) and Alexa Fluor 680-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) (1/6,000) for 1 h. Finally, membranes were incubated for 1 h with IRDye 800-conjugated streptavidin (Rockland) (1/6,000), and examined with the Odyssey Infrared Imaging system (LI-COR Biosciences).

Two-dimensional-PAGE immunoblot analysis

Human epidermis was ground with a liquid nitrogen-cooled mortar and pestle, and proteins were extracted from the resulting powder as previously described by Görg et al. (27). The protein extract (60 μl) was then subjected to two-dimensional-PAGE in which the first dimension was conducted on ReadyStrip IPG strips (11 cm, nonlinear pH 3–10 gradients; Bio-Rad) using the PROTEAN IEF cell system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. After IPG strip equilibration, the second dimension was run on 14% polyacrylamide gel (11 cm × 8 cm × 1 mm) using the Criterion Dodeca Cell system (Bio-Rad). Finally, gels were transferred onto nitrocellulose membranes. The IRF immunoblot analysis on protein-map replica was performed as described above.

HLA-DR peptide-binding assays

HLA-DRB1*0101, *0401, *0102, and *0402 molecules were immunopurified using L243 monomorphic Abs from HOM-2, BOLETH (a gift from Dr. C. de Toma, Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Paris, France), MZ07, and YAR cell lines, respectively. The binding capacities of the peptides were investigated in a competitive ELISA as described previously (28, 29). Briefly, the biotinylated peptide was incubated at pH 6 with a dose range of peptides to be tested and a fixed quantity of HLA-DR molecules. After 24–72 h, HLA-DR peptide complexes were trapped by L243 Abs adsorbed on ELISA plates. After washing, presence of the biotinylated peptide was revealed using streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Amersham Biosciences) and 4-methylumbelliferyl phosphate substrate. Emitted fluorescence was measured at 450 nm upon excitation at 365 nm. The biotinylated peptides used were as follows: HA 306–318 (PKYVKQNTLKLAT) for HLA-DRB1*0101 (1 nM) and HLA-DRB1*0401 (30 nM); and ALK (AALAAAKAAAAAA) for HLA-DRB1*0102 (10 nM) and HLA-DRB1*0402 (10 nM). Data were expressed as the concentration of peptide that prevented binding of 50% of the labeled peptide (IC_{50}). Each value is the mean from two independent experiments.

Proliferation assays

PBMC from pemphigus patients (2 PF and 1 PV) were isolated by Ficoll-Hypaque Plus (Amersham Biosciences) density gradient separation. Two × 10^5 PBMC were cultured in triplicate in 200 μl of RPMI 1640 (Cambrex BioScience) supplemented with 10% autologous plasma and containing either EC2/INT6 216–235 peptide, EC2/INT6 226–245 peptide (20 μg/ml), or PHA (Sigma-Aldrich) at 5 μg/ml for 6 days at 37°C in 5% CO_2. PBMC cultures were preformed without peptide and served as negative controls in each experiment. Cells in each individual well were pulsed with 1 μCi of [^{3}H]thymidine (Amersham Biosciences) during the last 18 h of incubation, and were then harvested using an automated cell harvester (PerkinElmer Applied Biosystems). Proliferation of PBMC was determined by measuring the [^{3}H]thymidine uptake (cpm) on a beta counter (Wallac). Data were presented both as average cpm ± SD and as stimulation index (SI): cpm of cells treated with EC2/INT6 peptides/cpm of cells without peptide. A SI ≥2 was considered as a positive response.

Results

cDNA amplification of DSG1-alternative transcript in human epidermis

To produce recombinant Dsg1, we previously sequenced a cDNA fragment encoding the entire EC domain of the protein (EC1–EC5) that was obtained by transcription of oligo(dT)-primed keratinocyte RNAs followed by nested PCR using primers located respectively at the 5′ and 3′ end of the nucleotide sequences encoding EC1 and EC5 (26). Surprisingly, we also found cDNAs corresponding to alternative *DSG1* mRNAs that contained a 101-bp insertion corresponding to the 3′ end of intron 6 localized between exon 6 and exon 7, which both code with exon 5 for the EC2 EC domain of Dsg1 (Fig. 1*A*). The intron 6 insertion contains a stop codon that could lead to a premature stop of the translation and thus to the production of a truncated isoform of Dsg1. If synthesized, this isoform would be composed of the EC1 domain, a part of the EC2 domain (158–227 aas), and an additional 17-mer peptide encoded by the intron 6 insertion (INT6) and absent from the transmembrane Dsg1 (Fig. 1*B*). To confirm the existence of *DSG1*-alternative transcript (*DSG1*-AT) in human epidermis, we amplified a specific cDNA sequence (amplimer of 101 bp) obtained from epidermis mRNAs, by PCR using primer sense (*DSG1*-AT sense) and primer antisense (*DSG1*-AT antisense) hybridizing the exon 6-intron 6 junction and the intron 6, respectively (Fig. 1*A*). Alternative transcripts of *DSG1* were detected in all human epidermis samples tested ($n = 9$) (Fig. 2*A*). Moreover, both *DSG1*-transcripts were also detected in cultured keratinocytes from human epidermis (data not shown). Therefore, alternative mRNAs of *DSG1* are physiologically expressed by keratinocytes of human epidermis.

Quantification of DSG1-alternative transcript in human epidermis

To quantify the expression of *DSG1*-alternative transcripts in human epidermis, we performed quantitative real-time PCR using LightCycler thermocycler. The efficiency of PCR amplifications was checked using standard curves generated by serial dilutions of purified *DSG1*-AT, *DSG1*, and *GAPDH* amplimers. PCR were very efficient, reaching an efficiency of 99.5% for *GAPDH*, *DSG1*, and *DSG1*-AT amplifications (Fig. 2*B*), and allowing the quantification of the two *DSG1* transcripts. Quantitative real-time PCR were then conducted for the nine human epidermis samples, and the specificity of each amplified product was confirmed by the fusion curve analysis (Fig. 2, *C* and *D*). Data obtained were normalized with *GAPDH* to evaluate the absolute copy number of both *DSG1* and *DSG1*-AT transcripts in each of the nine samples (Fig. 2*E*). The relative quantity of alternative transcript of Dsg1

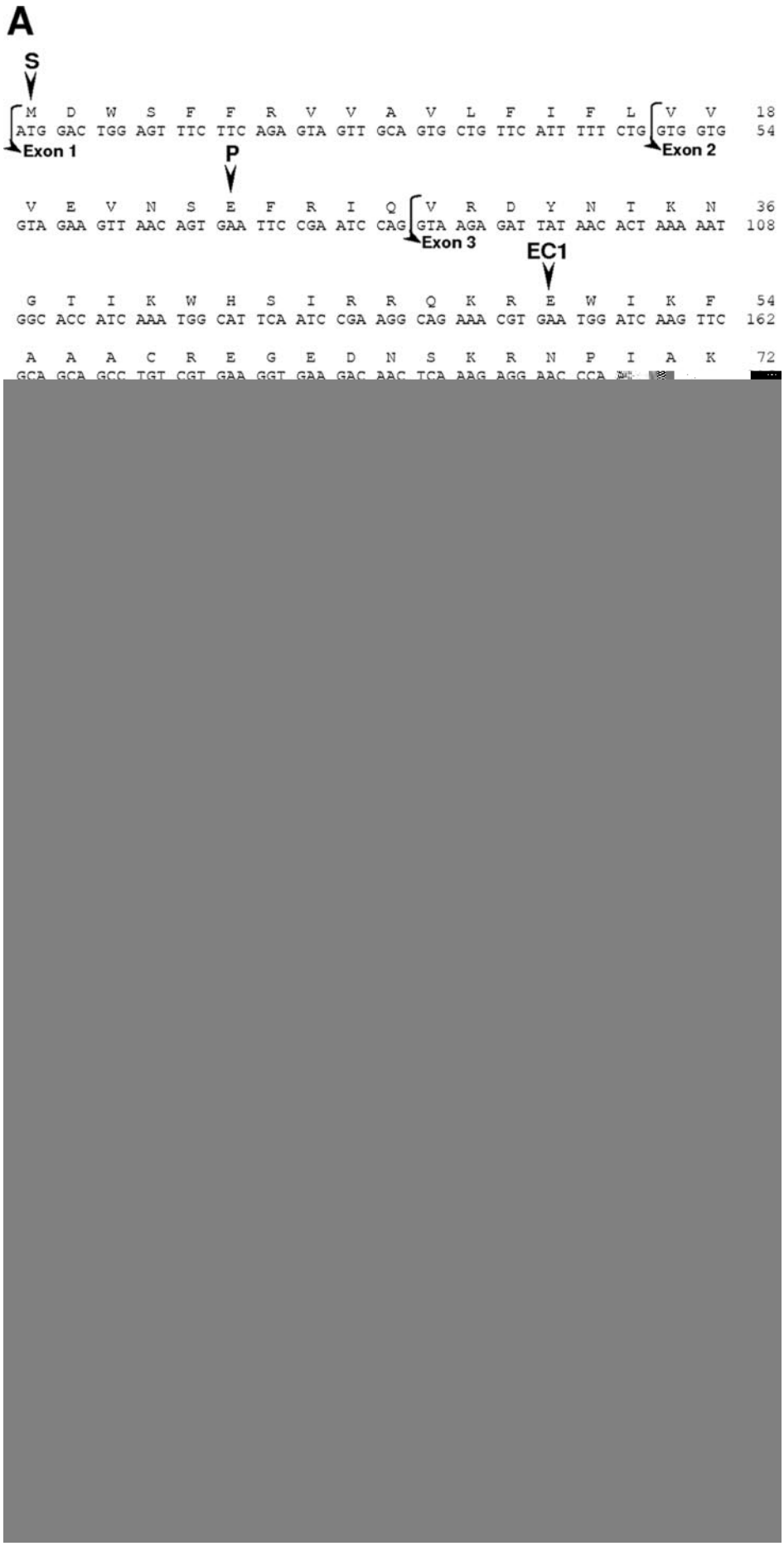


FIGURE 1. Nucleotide and amino acid sequences of the truncated isoform of Dsg1. cDNA sequence of the alternative mRNAs that encode for amino acids of a truncated isoform of Dsg1 (*A*). This isoform is composed of the signal peptide (S), the prosequence (P), the EC1 domain, and a part of the EC2 domain (157–227 aas) of Dsg1, and contains an additional 17-mer peptide (INT6) (black highlighting) encoded by a 101-bp intronic insertion corresponding to the 3′ end of the intron 6 (gray highlighting). This insertion introduces a stop codon that prematurely stops the translation of the protein. Compared with Dsg1 (*B*), its truncated isoform lacks the major part of the EC domains (a part of EC2 domain to the EC anchor domain (EA)) as well as the transmembrane domain (TM) and the entire intracellular domains of the native Dsg1. Primers used to amplify cDNA sequence of normal (*DSG1* sense and *DSG1* antisense) and alternative transcripts of *DSG1* (*DSG1*-AT sense and *DSG1*-AT antisense) are indicated on the cDNA sequence (*A*, underlined nucleotides).

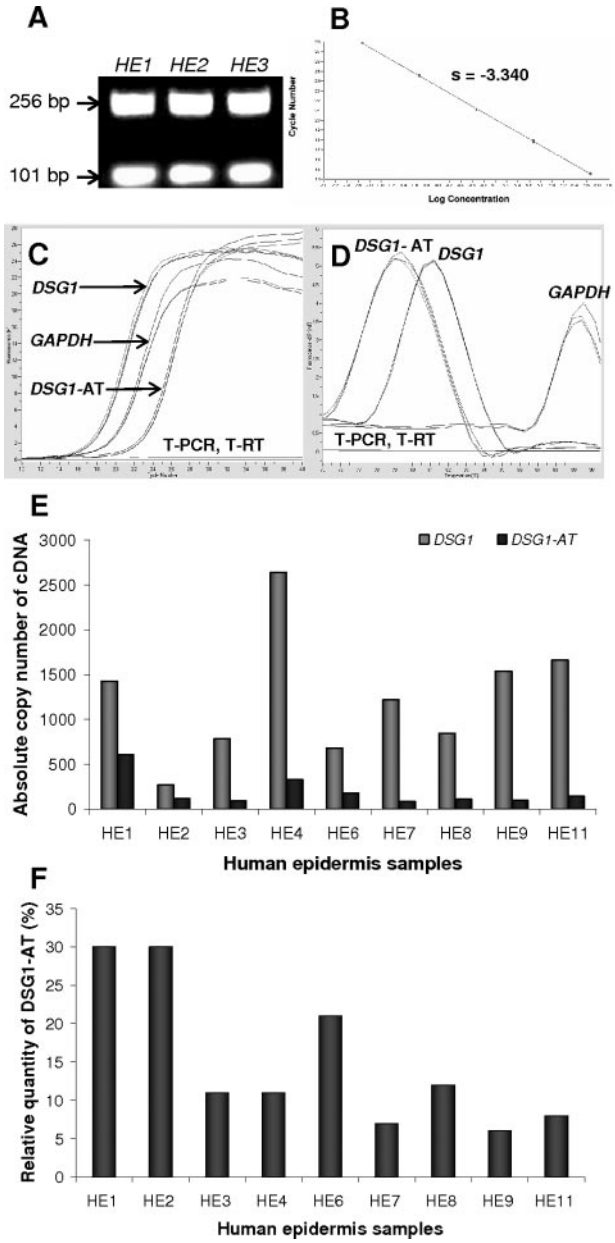


FIGURE 2. Amplification and quantification of normal (*DSG1*) and alternative (*DSG1*-AT) transcripts of *DSG1* in human epidermis by quantitative real-time PCR. Specific cDNA sequences of the *DSG1*-normal transcript (256 bp) and -alternative transcript (*DSG1*-AT) (101 bp) were amplified by classical PCR (HE1, HE2, and HE3 are representative of amplifications obtained with all human epidermis samples (HE)) (*A*). Quantitative real-time PCR were performed using the LightCycler thermocycler system. To determine the absolute copy number of target transcripts, purified *GAPDH*, *DSG1* and *DSG1*-AT cDNAs were used to generate calibration curves, which were also permitted to evaluate the PCR efficiencies using the formula: $e = 10^{-1/s}$ (s, slope) (with an efficiency equal to 2 ($s = -3.32$) that give an optimal value of 100%). PCR efficiencies for *GAPDH*, *DSG1*, and *DSG1*-AT amplifications were identical ($s = -3.340$; $e = 99.5\%$) (*B*). *GAPDH*, *DSG1*, and *DSG1*-AT amplifications of the nine human epidermis samples were then performed using the LightCycler thermocycler. A typical amplification of the HE1 sample is shown in *C*. The specifics of each amplified product were confirmed by fusion curve analysis (*D*). Copies of each target cDNA per 1000 copies of *GAPDH* (absolute copy number of cDNA) (*E*) allowed to evaluate the relative quantity of *DSG1*-AT: the absolute copy number of DSG1-alternative mRNAs was divided by those of total Dsg1 mRNAs (normal and alternative) (*F*). Results are presented in percentages.

expressed in human epidermis ranged from 6 to 30% with an average of ~15% (Fig. 2*F*). Therefore, one can conclude to an interindividual variability of the *DSG1*-alternative transcript expression in normal human skin.

Production and characterization of polyclonal Abs directed against EC2 and INT6 peptides

All CD1 mice immunized with the INT6 peptide, specific of the Dsg1-truncated isoform, and the NZ rabbit immunized with the EC2 (184–193) peptide, present in both Dsg1 and Dsg1-truncated proteins, produced IgG reacting with INT6 and EC2 peptides in a solid phase ELISA, respectively (Fig. 3*A*). Anti-peptide sera were then tested for their capacity to react with the recombinant truncated isoform of Dsg1 (EC1/2-INT6) by immunoblot analysis. Both anti-INT6 and anti-EC2 sera reacted with EC1/2-INT6 recombinant polypeptide that exhibited a molecular mass of 25-kDa (Fig. 3*B*). Next, to determine whether anti-EC2 peptide Abs also recognized the 184–193 aa sequence present in native Dsg1, indirect immunofluorescence analysis of human foreskin and immunoblotting experiment of human epidermis were performed with the rabbit antiserum. IgG anti-EC2 bound to the intercellular space of human epidermis (Fig. 4*B*) with a labeling pattern similar to that obtained with PF anti-Dsg1 Abs on human foreskin sections (Fig. 4*A*). Interestingly, anti-INT6 mouse sera gave a labeling pattern of human epidermis located at the suprabasal keratinocyte level (Fig. 4*C*). IgG anti-EC2 also reacted with a 160-kDa protein present in human epidermis extract that comigrated with Dsg1 (Fig. 5*A*).

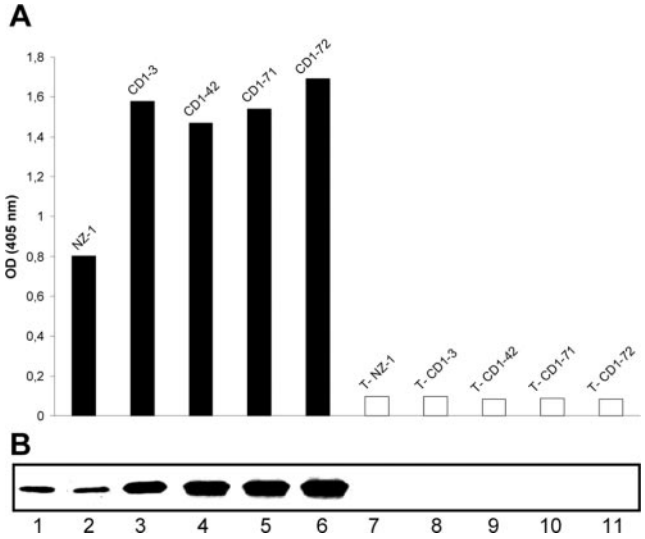


FIGURE 3. Binding capacity of peptide-immunized animal sera to (*A*) peptides, assessed by ELISA and to (*B*) recombinant truncated isoform of Dsg1 (EC1/2-INT6) by immunoblotting. *A*, EC2 (184–193) or INT6 peptide-coated ELISA plates were saturated, incubated successively with rabbit or mouse sera (1/100) (immune sera (■) or preimmune sera (□)), biotin-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG, and phosphatase-conjugated streptavidin. The reaction was revealed by adding *p*-nitrophenyl phosphate. OD were determined at 405 nm. NZ White rabbit serum; CD1, CD1 mouse sera. *B*, The purified biotinylated-EC1/2-INT6 recombinant protein was electrotransferred onto nitrocellulose filters that were then saturated, incubated with mouse or rabbit serum (1/50) and with peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG, and revealed by chemiluminescence reaction. *Lane 1*, peroxidase-conjugated streptavidin; *lane 2*, anti-EC2-NZ rabbit serum; *lanes 3–6*, anti-INT6-CD1 mouse sera; *lane 7*, preimmune NZ rabbit serum; *lanes 8–11*, preimmune CD1 mouse sera.

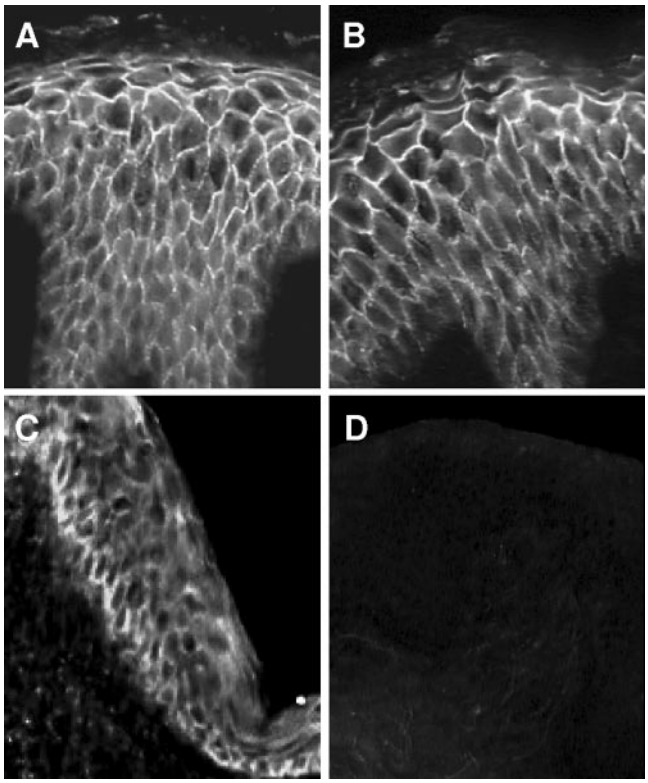


FIGURE 4. Indirect immunofluorescence assay of anti-peptide sera on human foreskin. Tissue sections were incubated with anti-EC2 or anti-INT6 sera, washed, and incubated with FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG Abs or FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG Abs (original magnification, ×400). Anti-EC2 serum (*B*) gave an intercellular labeling pattern of the epidermis similar to that obtained with an anti-Dsg1-positive PF serum (*A*). Anti-INT6 sera gave a labeling pattern of suprabasal keratinocytes (*C*) that was not observed with preimmune sera (*D*).

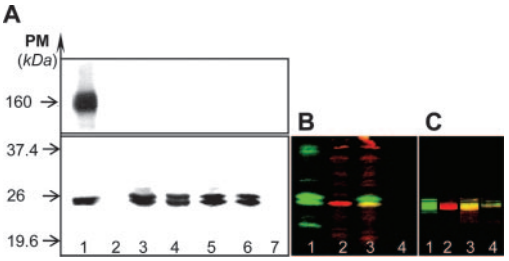


FIGURE 5. Classical (*A*) and IRF immunoblot analyses (*B* and *C*) of anti-peptide sera. Human epidermis extract (*A* and *B*) or biotinylated-EC1/2-INT6 recombinant protein (*C*) were separated by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose filters. Saturated filters were incubated with rabbit or mouse serum (1/50) then with peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG and revealed by chemiluminescence reaction. *A*, *Lane 1*, Anti-EC2-NZ rabbit serum; *lane 2*, preimmune NZ rabbit serum; *lane 3*, CD1–3 anti-INT6 serum; *lane 4*, CD1–42 anti-INT6 serum; *lane 5*, CD1–71 anti-INT6 serum; *lane 6*, CD1–72 anti-INT6 serum; *lanes 7–10*, preimmune CD1 mouse sera. For IRF immunoblot analysis, saturated filters were incubated simultaneously with anti-EC2-NZ rabbit serum and anti-INT6-CD1 mouse sera, and, after washing, simultaneously with biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 680-conjugated goat anti-mouse IgG, and finally with IRDye 800-conjugated streptavidin. Replicas were examined with the Odyssey Infrared Imaging system. *B* and *C*, *Lane 1*, Anti-EC2-NZ rabbit serum; *lane 2*, anti-INT6 mouse serum; *lane 3*, anti-EC2-NZ rabbit serum plus anti-INT6 mouse serum; *lane 4*, preimmune NZ rabbit and CD1 mouse sera. IRF immunoblot analysis shows that both anti-EC2-NZ rabbit and anti-INT6 mouse sera bound to the 25-kDa protein with the superimposed red and green signals giving the yellow band.

Abs directed against the recombinant truncated isoform of Dsg1 also recognize a 25-kDa protein expressed by human epidermal cells

Once characterized, anti-EC2 and anti-INT6 sera were used as specific probes in immunoblot experiments on epidermal extract to determine the existence of the truncated isoform of Dsg1 in human epidermis. All four anti-INT6 sera reacted with a 25-kDa polypeptide doublet; whereas anti-EC2 serum reacted with a single 25-kDa protein. None of the preimmune sera bound to epidermal proteins with this molecular mass (Fig. 5*A*). Immunoblotting with anti-INT6 sera showed that the 25-kDa polypeptide doublet was also present in a cultured-keratinocyte extract (data not shown). When the replica was incubated with anti-INT6 and anti-EC2 sera simultaneously, the IRF immunoblot showed that the lower band of the 25-kDa polypeptide doublet was recognized by both sera (Fig. 5*B*, *lane 3*, yellow band) as well as the 25-kDa recombinant Dsg1-truncated isoform (Fig. 5*C*, *lane 3*, yellow band). In contrast, both Dsg1 and Dsg1-truncated isoform were not detected in other tested human epithelial tissues like kidney and small intestine (data not shown). Thus, the immunological identity of the 25-kDa protein present in human epidermal extract with the recombinant Dsg1-truncated isoform constitutes a first strong argument speaking for the Dsg1-truncated isoform expression in human epidermal cells. This argument was further supported by an IRF immunoblot analysis of a two-dimensional-PAGE-separated human epidermis protein map with anti-INT6 and anti-EC2 sera as specific probes of the truncated isoform of Dsg1. Both sera bound to a single epidermal protein (Fig. 6), which had molecular mass and isoelectric point (pI) coordinates (25-kDa, pI 4.7) close to those theoretically calculated for the truncated isoform of Dsg1 (22.4-kDa, pI 5.5) (Fig. 6*C*, yellow spot) (data obtained in triplicate), and that correspond to the lower band of the 25-kDa polypeptide doublet recognized by both anti-INT6 and anti-EC2 sera in IRF immunoblotting experiments.

*A specific amino acid sequence of the truncated isoform of Dsg1 binds to the DRβ1*0102 molecule*

The truncated isoform of Dsg1 bears amino acid sequences that are absent from the transmembrane Dsg1, particularly the INT6 peptide and peptide-overlapping sequences with INT6 and the EC2 domain. This observation is reminiscent of the two isoforms of myelin basic protein (MBP) (21.5-kDa and 20.2-kDa), which are expressed during the remyelinization process, and contain an exon 2-encoded protein, X2MBP, which is absent from the major isoform of MBP (18.5-kDa). In multiple sclerosis, specific T cell responses directed against X2MBP were associated with the disease (30). To test the possibility that peptides of the Dsg1-truncated isoform bind to HLA class II molecules that predispose to PF, we synthetized four overlapping 20-mer peptides between EC2 domain and INT6 peptide (EC2/INT6 211–230, EC2/INT6 216–235, EC2/INT6 221–240, and EC2/INT6 226–245) and evaluated by a competitive ELISA, their relative binding capacity to HLA class II, DRβ1*0102, and DRβ1*0402, which were previously demonstrated to be associated with the disease in French PF patients (17, 19). Interestingly, the EC2/INT6 216–235 peptide bound to the DRβ1*0101, *0102, *0401, and *0402 molecules, because it exhibited toward all these molecules IC_{50} values inferior to the binding activity threshold of 1000 nM (Table II). Moreover, as compared with the reference peptides that are very good binders, its IC_{50} was of 3.4 toward DRB1*0102 and less high a factor of 20 toward DRB1*0101, *0401, and *0402 molecules. It can

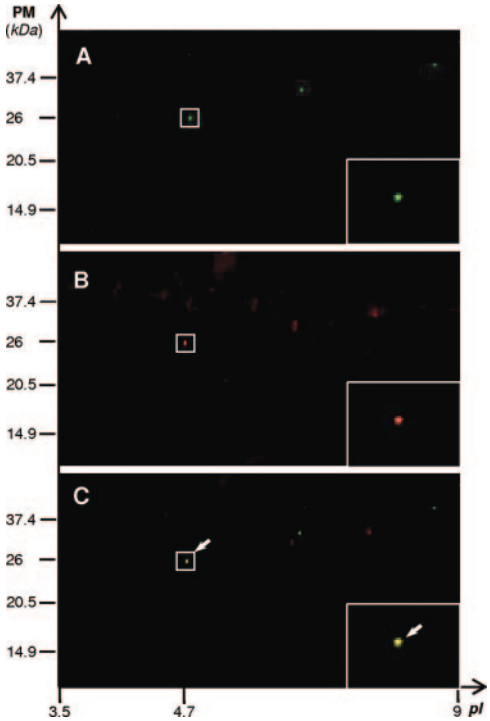


FIGURE 6. IRF immunoblotting of a two-dimensional-PAGE-separated human epidermis protein map with anti-peptide sera. Human epidermis extract was separated by two-dimensional-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes, which were incubated simultaneously with anti-EC2-NZ rabbit serum and anti-INT6 mouse sera, and, after washing, simultaneously with biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 680-conjugated goat anti-mouse IgG, and finally with IRDye 800-conjugated streptavidin. Replicas were examined with the Odyssey Infrared Imaging system. *A*, anti-INT6 mouse serum; *B*, anti-EC2-NZ rabbit serum; *C*, anti-EC2-NZ rabbit serum plus anti-INT6 mouse serum. IRF immunoblot analysis shows that both anti-EC2-NZ rabbit and anti-INT6 mouse sera bound to a single 25-kDa protein with the superimposed red and green signals giving the yellow spot (immunoreactive spots are magnified at the *right bottom corner*). Molecular masses are indicated on the ordinate and pI in abscissa.

therefore be considered as a good peptide binder for these molecules.

A specific amino acid sequence of the truncated isoform of Dsg1 induces the proliferation of PBMC from PF patients

To determine whether T cells proliferate in response to the EC2/INT6 216–235 peptide, we performed proliferation assays with PBMC from PF ($n = 8$) and PV ($n = 13$) patients (Table I). PBMC from four PF (PF1, PF2, PF5, and PF7) (50%) and one PV (PV4) (7.7%) patients showed a proliferative response to the EC2/INT6 216–235 peptide, whereas cells from only one PF patient (PF5) proliferated in presence of the EC2/INT6 226–245 peptide (Fig. 7). Interestingly, two PF patients (PF1 and PF7) whose PBMC showed a positive response to the EC2/INT6 216–235 peptide (SI = 3.2 and 3, respectively), carry the DRβ1*0102 allele (Fig. 7*C*). PBMC from PF2 patient, who carries the DRβ1*0101 allele previously reported to be overrepresented in PF (31) and shown to bind efficiently to EC2/INT6 216–235 peptide in our study, proliferated in response to this peptide (SI = 2.2). Only one PV patient carrying the DRβ1*0402 allele, which was detected in 8 of 13 PV patients (Fig. 7*B*), exhibited a significant T cell proliferation induced by the EC2/INT6 216–235 peptide (SI = 5) (Fig. 7*B*). No correlation was observed between the capacity of T cells to proliferate in response to the EC2/INT6 216–235 peptide and the presence of anti-Dsg1 Abs at the time of the study. Finally, T cells from BP patients ($n = 6$) did not proliferate in presence of the EC2/INT6 226–245 peptide (Fig. 7*C*).

Therefore, these data indicate that a specific amino acid sequence of the truncated isoform of Dsg1 that efficiently bound to the DRβ1*0102 molecule also can induce the proliferation of T cells from PF patients.

Table II. *Binding capacities of 20-mer peptides overlapping EC2 domain and INT6 peptide of the truncated isoform of Dsg1 to immunopurified HLA-DR molecules.*[a]

Peptides	DRβ1 Alleles			
	0101	0102	0401	0402
Biotinylated peptides				
HA	1		30	
ALK		63		39
Dsg1-truncated isoform peptides				
EC2/INT6 211–230	2828	2426	5000	2289
EC2/INT6 216–235	**95**	**215**	**387**	**391**
EC2/INT6 221–240	1732	-	1732	-
EC2/INT6 226–245	4899	-	-	-

[a] IC_{50} values (nM) inferior to 1,000 nM are in bold; -, activity superior to 100,000 nM. Blank, peptides were not tested. HA, hemagglutinin.

Discussion

We described, for the first time, the existence of alternative transcript of *DSG1* in human epidermis. The transcript contains a 101-bp insertion, which corresponds to 3′ end of *DSG1*-intron 6 and introduces a new stop codon in the nucleotide sequence. The stop codon is located 51 nucleotides downstream from the beginning of intron 6 insertion and leads to the translation of a truncated isoform of Dsg1 constituted of the Dsg1-EC1 domain, a part of the Dsg1-EC2 domain and an additional 17-mer peptide encoded by the first 51 nucleotides of the intron 6 insertion. Polyclonal Abs directed against the EC2 and the intron-encoded (INT6) peptides reacted not only with the recombinant truncated isoform of Dsg1 but also with a 25-kDa epidermal protein present in a two-dimensional-PAGE-separated human epidermis protein map. Indeed, the immunoreactive protein had molecular mass and pI coordinates similar to the theoretical coordinates of the truncated isoform of Dsg1. In addition, immunoblot analysis of human keratinocytes in primary culture with the anti-INT6 serum showed that this 25-kDa protein was synthesized by human keratinocytes. No protein with a 25-kDa molecular mass and recognized by anti-INT6 sera could be detected in other tested organs. Thus, our results demonstrate that a truncated isoform of Dsg1 encoded by alternative transcript is physiologically expressed in the epidermis of normal individuals and by keratinocytes. They also provide another ex vivo demonstration that the major autoantigen target of the autoimmune response observed during an organ-specific autoimmune disease, has an alternative spliced isoform. Indeed, it has been recently estimated on the basis of an in silico study that autoantigens display a higher frequency (100 vs 42%) of alternative splicing than transcripts of randomly selected non-autoantigens, suggesting that alternative splicing plays a role in the pathogenesis of systemic and organ-specific autoimmune diseases. In addition, this in silico study indicated that a significantly higher rate of noncanonical splicing was observed in autoantigen transcripts compared with those of randomly selected genes (80 vs 1%) (32). Interestingly, the posttranscriptional splicing of Dsg1 observed in our study is

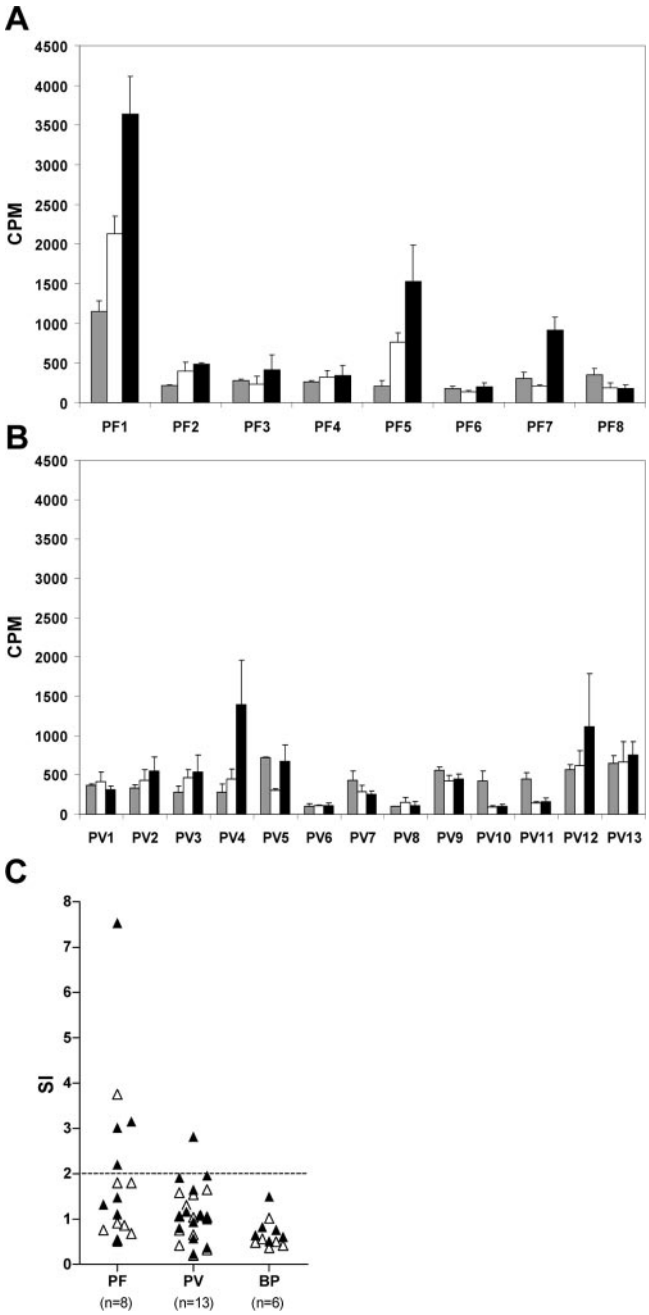


FIGURE 7. Proliferative responses of PBMC from pemphigus patients to EC2/INT6 216–235 and 226–245 peptides. The proliferation of PBMC from 8 PF (*A*) and 13 PV (*B*) patients cultured without peptides (▨), with the EC2/INT6 226–245 peptide (□) or EC2/INT6 216–235 peptide (■), was determined by the uptake of [^{3}H]thymidine after 6 days. Proliferation assays were performed in triplicate and are expressed as average cpm ± SD. SI representing the ratio of cpm in cultures with EC2/INT6 peptides (226–245 (△) or 216–335 (▲)) and cultures without peptides are shown in *C*. A SI >2 was considered as a positive response. Cells from four PF (50%) and one PV (7.7%) patients showed a proliferative response to the EC2/INT6 216–235 peptide, whereas cells from the BP patients did not.

noncanonical because the intron 6 flanking sequences do not share the 5′-GT and 3′-AG consensus sequence.

This truncated isoform of Dsg1 may have different roles. First, from a physiological viewpoint, this truncated isoform that lacks the major part of the EC domain, the transmembrane domain, and the entire intracellular domain of the native Dsg1, could be soluble, unable to exert cell-cell adhesion function, and thus could induce a fragility of desmosomal junction. Indeed, it was previously shown that in vitro-synthesized truncated form of Dsg1 compromises desmosomes when added to keratinocyte tumor cell line culture (33). Second, and from an immunological viewpoint, it is well established that the translation of autoantigen isoforms encoded by alternative transcripts can play a role in the initiation and maintenance of systemic or organ-specific autoimmune responses through different mechanisms (32). A first mechanism proposes that an autoantigen isoform expressed in the thymus and lacking a T cell epitope borne by the full autoantigen expressed at the periphery, may prevent clonal deletion of autoreactive T cells. This is illustrated by murine experimental allergic encephalomyelitis in which the thymic expression of DM20, a shorter form of the proteolipid protein lacking 35-aa stretch, has been correlated with the presence of autoreactive T cells specific to the complete form of proteolipid protein expressed in the CNS but excluded from the thymus (4). Similarly, an alternatively spliced transcript of the pancreatic islet cell Ag 512 (ICA512/IA-2), which lacks sequence that encodes several T cell epitopes and is exclusively expressed in thymus, has been described and could be responsible for a tolerance breakdown against ICA512/IA-2 in type 1 diabetes (5). According to another mechanism, autoantigen isoforms could contain new epitopes susceptible to be recognized specifically by autoreactive T cells or autoantibodies. For example, in multiple sclerosis, specific T cell responses against X2MBP, an exon 2-encoded protein expressed by two isoforms of MBP during remyelinization process (21.5- and 20.2-kDa) and, absent from the major isoform of MBP (18.5-kDa), were correlated with disease progression (30). Closer to our observation is the demonstration that a truncated and soluble isoform of the IL-6 signal-transducing molecule gp130, which is translated from alternatively spliced mRNA, contains a specific epitope frequently targeted by the autoimmune response in patients with rheumatoid arthritis (34). One should add that the in silico study cited above (32) showed, by using appropriate algorithms, that most alternative spliced isoform regions of autoantigens encode potential MHC class I- and/or class II-restricted T cell epitopes.

These considerations prompted us to examine the potential role of the truncated isoform of Dsg1 in the T cell autoimmune response occurring in the course of PF. We tested the possibility that specific amino acid sequences of the truncated protein could bind to PF-associated HLA class II molecules. We thus set up an HLA-DR peptide-binding assay to evaluate the relative binding affinities of four peptides overlapping EC2 domain and INT6 sequences to four HLA class II molecules. The overlapping peptide EC2/INT6 216–235 of the Dsg1-truncated isoform bound to all HLA-DR molecules tested and to the PF-related DRβ1*0102 allele with the highest affinity. Moreover, the EC2/INT6 216–235 peptide was able to induce T cell proliferation in four PF patients (50%). Three of them carried the HLA class II alleles (DRβ1*0102 and *0101) shown to accommodate with a high affinity the selected peptide in our binding experiments. Although the subtype of the DR14 molecule expressed by the fourth PF patient, whose PBMC proliferated was not determined, one should mention that several PF-associated DR14 molecules, namely *1401 and *1406, share amino acid residues (LLEQRRAA) at critical positions of the peptide-binding groove with DRβ1*0102 and *0101 (31). One should also note that T cells from a DRβ1*0101 PF patient (PF6) did not proliferate when stimulated by the selected EC2/INT6 peptide, although the patient had a high anti-Dsg1 Ab titer (202 U/ml). As a matter of fact, T cell proliferation not only requires peptide presentation by APCs but also a sufficient number of peptide-specific T cells with adequate functional properties. Thus, on the one hand and according to their HLA class II genotype and T cell repertoire,

not all PF patients may have the capacity to mount an autoimmune response to the T cell epitope borne by the Dsg1-truncated isoform, and, on the other hand, the clinical status (remission vs acute onset) and the therapeutic regimen may modulate the proliferative capacity of T cells. Among 13 PV patients, only one had a T cell proliferative response to the EC2/INT6 216–235 peptide. Interestingly, this patient had a mucocutaneous phenotype of the disease and carried the DRβ1*0402 allele that also was shown to bind the Dsg1-truncated isoform-derived peptide. PBMC obtained from other mucocutaneous PV bearing the DRβ1*0402 allele did not proliferate, indicating that this PV-associated HLA class II allele is per se not sufficient to trigger T cell proliferation and that other molecular and cellular factors are required.

Therefore, on the basis of results observed in PF patients, one can hypothesize that the soluble Dsg1-truncated isoform is processed by APCs bearing DRβ1*0102 molecules, which then present specific epitope EC2/INT6 216–235 to autoreactive T cells. Once primed, these T cells could activate Dsg1-specific B-cells and, finally, trigger the production of anti-Dsg1 autoantibodies.

In conclusion, we demonstrated the existence of a truncated isoform of Dsg1 in human epidermis, encoded by alternative transcript, and possessing a specific peptide bound by PF-associated HLA class II DRβ1*0102 molecules that could participate in the tolerance breakage to Dsg1.

Acknowledgments

We thank dermatologists of the French Bullous Study Group who have participated in this study.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 291–336.
2. Zinkernagel, R. M., and H. Hengartner. 2001. Regulation of the immune response by antigen. *Science* 293: 251–253.
3. Bach, J. F., S. Koutouzov, and P. M. van Endert. 1998. Are there unique autoantigens triggering autoimmune diseases? *Immunol. Rev.* 164: 139–155.
4. Klein, L., M. Klugmann, K. A. Nave, V. K. Tuohy, and B. Kyewski. 2000. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* 6: 56–61.
5. Diez, J., Y. Park, M. Zeller, D. Brown, D. Garza, C. Ricordi, J. Hutton, G. S. Eisenbarth, and A. Pugliese. 2001. Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. *Diabetes* 50: 895–900.
6. Whittock, N. V., and C. Bower. 2003. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *J. Invest. Dermatol.* 120: 523–530.
7. Schafer, S., P. J. Koch, and W. W. Franke. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp. Cell. Res.* 211: 391–399.
8. Amagai, M., K. Ishii, T. Hashimoto, S. Gamou, N. Shimizu, and T. Nishikawa. 1995. Conformational epitopes of pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) are calcium dependent and glycosylation independent. *J. Invest. Dermatol.* 105: 243–247.
9. Emery, D. J., L. A. Diaz, J. A. Fairley, A. Lopez, A. F. Taylor, and G. J. Giudice. 1995. Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein 1. *J. Invest. Dermatol.* 104: 323–328.
10. Sekiguchi, M., Y. Futei, Y. Fujii, T. Iwasaki, T. Nishikawa, and M. Amagai. 2001. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J. Immunol.* 167: 5439–5448.
11. Roscoe, A., L. Diaz, S. A. Sampaio, R. M. Castro, R. S. Labib, Y. Takahashi, H. Patel, and G. J. Anhalt. 1985. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J. Invest. Dermatol.* 85: 538–541.
12. Amagai, M., T. Hashimoto, K. J. Green, N. Shimizu, and T. Nishikawa. 1995. Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J. Invest. Dermatol.* 104: 895–901.
13. Ishii, K., M. Amagai, R. P. Hall, T. Hashimoto, A. Takayanagi, S. Gamou, N. Shimuzu, and T. Nishikawa. 1997. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J. Immunol.* 159: 2010–2017.
14. Amagai, M., T. Nishikawa, H. C. Nousari, G. J. Anhalt, and T. Hashimoto. 1998. Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. *J. Clin. Invest.* 102: 775–782.
15. Lin, M. S., C. L. Fu, V. Aoki, G. Hans-Filho, E. A. Rivitti, J. R. Moraes, M. E. Moraes, A. M. Lazaro, G. J. Giudice, P. Stastny, and L. A. Diaz. 2000. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J. Clin. Invest.* 105: 207–213.
16. Moraes, J. R., M. E. Moraes, M. Fernandez-Vina, L. A. Diaz, H Friedman, I. T. Campbell, R. R. Alvarez, S. A. Sampaio, E. A. Rivitti, and P. Stastny. 1991. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. *Immunogenetics* 33: 388–391.
17. Loiseau, P., L. Lecleach, C. Prost, V. Lepage, M. Busson, S. Bastuji-Garin, J. C. Roujeau, and D. Charron. 2000. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J. Autoimmun.* 15: 67–73.
18. Miyagawa, S., M. Amagai, H. Niizeki, Y. Yamashina, T. Kaneshige, T. Nishikawa, T. Shirai, and H. Inoko. 1999. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. *Tissue Antigens* 54: 333–340.
19. Martel, P., D. Gilbert, M. Busson, P. Loiseau, V. Lepage, L. Drouot, E. Delaporte, C. Prost, P. Joly, D. Charron, and F. Tron. 2000. Epistasis between *DSG1* and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. *Genes Immun.* 3: 205–210.
20. Vandenbroucke, I. I., J. Vandesompele, A. D. Paepe, and L. Messiaen. 2001. Quantification of splice variants using real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e68.
21. Karsai, A., S. Muller, S. Platz, and M. T. Hauser. 2002. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *BioTechniques* 32: 790–792, 794–796.
22. Raaijmakers, M. H., L. Van Emst, T. De Witte, E. Mensink, and R. A. Raymakers. 2002. Quantitative assessment of gene expression in highly purified hematopoietic cells using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Exp. Hematol.* 30: 481–487.
23. Wellmann, S., T. Taube, K. Paal, H. G. Von Einsiedel, W. Geilen, G. Seifert, C. Eckert, G. Henze, and K. Seeger. 2001. Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin. Chem.* 47: 654–660.
24. Marcucci, G., M. A. Caligiuri, H. Dohner, K. J. Archer, R. F. Schlenk, K. Dohner, E. A. Maghraby, and C. D. Bloomfield. 2001. Quantification of CBFβ/MYH11 fusion transcript by real-time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 15: 1072–1080.
25. Kallel Sellami, M., M. Ben Ayed, H. Mouquet, L. Drouot, M. Zitouni, M. Mokni, M. Cerruti, H. Turki, B. Fezza, I. Mokhtar, et al. 2004. Anti-desmoglein 1 antibodies in Tunisian healthy subjects: arguments for the role of environmental factors in the occurrence of Tunisian pemphigus foliaceus. *Clin. Exp. Immunol.* 137: 195–200.
26. Mouquet, H., L. Drouot, R. Charlionnet, C. Arnoult, F. Bonnet-Bayeux, M. Thomas, J. Leprince, P. Joly, F. Tron, and D. Gilbert. 2006. Proteomic analysis of the autoantibody response following immunization with a single autoantigen. *Proteomics* 6: 4829–4837.
27. Görg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Csordas, J. J. Diaz, and J. J. Madjar. 1997. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* 18: 328–337.
28. Texier, C., S. Pouvelle, M. Busson, M. Herve, D. Charron, A. Menez, and B. Maillere. 2000. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J. Immunol.* 164: 3177–3184.
29. Texier, C., S. Pouvelle-Moratille, M. Busson, D. Charron, A. Menez, and B. Maillere. 2001. Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. *Eur. J. Immunol.* 31: 1837–1846.
30. Voskuhl, R. R., D. E. McFarlin, L. R. Tranquill, G. Deibler, R. Stone, H. Maloni, and H. F. McFarland. 1993. A novel candidate autoantigen in a multiplex family with multiple sclerosis: prevalence of T-lymphocytes specific for an MBP epitope unique to myelination. *J. Neuroimmunol.* 46: 137–144.
31. Pavoni, D. P., V. M. M. S Roxo, A. Marquart Filho, and M. L. Petzl-Erler. 2003. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. *Genes Immun.* 4: 110–116.
32. Ng, B., F. Yang, D. P. Huston, Y. Yan, Y. Yang, Z. Xiong, L. E. Peterson, H. Wang, and X. F. Yang. 2004. Increased noncanonical splicing of autoantigen transcripts provides the structural basis for expression of untolerized epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: 1463–1470.
33. Serpente, N., C. Marcozzi, G. A. Roberts, Q. Bao, B. D. Angst, E. M. Hirst, I. D. Burdett, R. S. Buxton, and A. I. Magee. 2000. Extracellularly truncated desmoglein 1 compromises desmosomes in MDCK cells. *Mol. Membr. Biol.* 17: 175–183.
34. Tanaka, M., M. Kishimura, S. Ozaki, F. Osakada, H. Hashimoto, M. Okubo, M. Murakami, and K. Nakao. 2000. Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 106: 137–144.

B- L'immunisation de souris normales avec la desmogléine 1 induit une diversification de réponse anticorps vis à vis d'autres composants du desmosome

L'étude des propriétés et des modes d'action des autoAc produits au cours des pemphigus a été cruciale pour l'identification des autoaAg épidermiques qui sont la cible de la réponse auto-immune, la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie et le développement d'outils diagnostiques et thérapeutiques. A cet égard, la caractérisation des Acm anti-Dsg générés à partir de souris immunisées avec les Dsg recombinantes a notamment participé de façon essentielle à la dissection des phénomènes moléculaires impliqués dans la physiopathologie des pemphigus.

L'objectif initial de notre travail a consisté à produire des Acm dirigés contre la Dsg1. Nous avons donc produit dans le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte, la région extracellulaire (EC) recombinante de la Dsg1 (rEC1/5-Dsg1) qui comporte à son extrémité C-terminale des peptides histidine et un FLAG permettant sa purification par chromatographie d'affinité. Des souris normales BALB/c et CD1 (10 de chaque) ont été immunisées avec la protéine rEC1/5-Dsg1 purifiée. La production des IgG anti-Dsg1 dans le sérum des souris, contrôlée par ELISA utilisant rEC1/5-Dsg1 comme Ag, a été observée chez l'ensemble des animaux immunisés. La reconnaissance de la région EC de la Dsg1 par les sérums a été testée par immunoempreinte de la protéine rEC1/5-Dsg1 et d'un extrait protéique d'épiderme humain. Ces analyses ont montré que les sérums des souris BALB/c-2 (B2) et CD1-2 (C2) réagissent à la fois avec la Dsg1 et avec d'autres protéines épidermiques de plus haut poids moléculaire. Les sérums des souris B2 et C2 reconnaissent respectivement, une protéine de 190 kDa et un doublet protéique de 190-210 kDa. Quatre animaux dont les souris B2 et C2 ont été sélectionnés pour la fusion des splénocytes murins avec le myélome SP2/O. Trois hybridomes (1N5, 1D8 et 8C3) ont été selectionnés sur leur capacité à sécréter des IgG réagissant avec la protéine rEC1/5-Dsg1 en ELISA puis clonés. Les analyses en IFI montrent que ces Acm donnent un marquage fluorescent « en résille » de l'épiderme humain identique à celui observé avec des IgG anti-Dsg1 mais contrairement aux sérums des souris dont ils sont isolés, ne se fixent pas aux cellules épithéliales de l'œsophage de souris. A l'instar de l'Acm 8C3, 1N5 et 1D8 reconnaissent en immunoempreinte la protéine rEC1/5-Dsg1 et la Dsg1 présente dans l'extrait d'épiderme humain.

Deux autres hybridomes, CK1 et 10A1, qui dérivent respectivement des souris C1 et B2 dont les sérums réagissent avec d'autres Ag épidermiques en plus de la Dsg1, ont été sélectionnés par IFI et clonés. L'Acm CK1 donne à la fois un marquage fluorescent de la SIC et de la membrane basale sur les sections de prépuce humain et d'œsophage de souris. Les analyses en immunoempreinte sur un extrait d'épiderme humain montrent

que tout comme le sérum parental, CK1 reconnaît un doublet protéique de 190-210 kDa. L'Acm 10A1 donne un marquage intercellulaire des tissus épithéliaux humain et murin en IFI et reconnaît en immunoempreinte, une protéine unique de 190 kDa présente dans un extrait d'épiderme humain. De plus, les expériences de comarquage par immunoempreinte infrarouge montrent que les protéines réagissant avec CK1 et 10A1 sont aussi reconnues par le sérum d'un patient atteint de PPN.

Afin d'identifier les Ag de 190 et 210 kDa, ces Acm ont été utilisés pour l'immunocriblage d'une carte protéique 2D d'épiderme humain. Il est à noter qu'une optimisation technique du procédé d'électrophorèse bidimensionnelle a préalablement été nécessaire afin d'accroître la représentativité des protéines de haut poids moléculaire (> 150 kDa) sur la carte 2D, quasiment absentes du gel quand la migration est effectuée selon la méthode conventionnelle. Les analyses des spectres de masse des taches protéiques de 190 et 210 kDa reconnues en immunoempreinte sur la carte protéique 2D et obtenues après excision du gel d'acrylamide, digestion trypsique et spectrométrie de masse MALDI-ToF démontrent que 10A1 reconnaît la périplakine (190 kDa) et CK1, à la fois l'envoplakine (210 kDa) et la périplakine. Par ailleurs, l'immunocriblage d'une banque d'expression d'ADNc de kératinocytes humains avec CK1 et réalisé en parallèle de la stratégie d'identification décrite précédemment montrent que cet Acm reconnaît plus précisément le sous-domaine de liaison (*linker subdomain*) de l'envoplakine qui partage environ 50% d'identité avec celui de la périplakine. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Proteomics*.

ARTICLE 2

Proteomic Analysis of the Autoantibody Response Following Immunization with a Single Autoantigen.

H. Mouquet, L. Drouot, R. Charlionnet, C. Arnoult, F. Bonnet-Bayeux, M. Thomas, J. Leprince, P. Joly, F. Tron, D. Gilbert.

Proteomics 2006:6;4829–37.

RESEARCH ARTICLE

Proteomic analysis of the autoantibody response following immunization with a single autoantigen

Hugo Mouquet[1], Laurent Drouot[1], Roland Charlionnet[1], Christophe Arnoult[1], Florence Bonnet-Bayeux[1], Marlène Thomas[1], Jérôme Leprince[2], Pascal Joly[1], François Tron[1] and Danièle Gilbert[1]

[1] Inserm, U519 and IFR23, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rouen, France
[2] Inserm, U413, Mont Saint Aignan, France

In most autoimmune diseases, the autoantibody response is directed against several antigens of the target organ whose identification is crucial for understanding the physiopathological process. Thus, technologies allowing a characterization of the whole autoantibody pattern of both human and experimental autoimmune diseases are required. Here we have used immunoproteomic analysis of human epidermal extracts to characterize the diversity of the anti-desmosome antibody response induced in normal mice immunized with desmoglein 1, the major autoantigen of pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. In particular, this analysis enables us to characterize the binding properties of anti-desmosome mAbs derived from these mice and to show that the autoantibody response induced upon immunization with a single autoantigen targets different epidermal autoantigens with a pattern similar to that observed in certain variety of human pemphigus.

Received: August 25, 2005
Revised: May 5, 2006
Accepted: May 17, 2006

Keywords:
Antigen spreading / Desmoglein 1 / Immunoproteomics / Pemphigus / Plakins

1 Introduction

Autoantigens play a major role in the physiopathology of autoimmune diseases. They participate in the breakage of lymphocyte tolerance and thus initiate the B and T cell autoimmune response as demonstrated, in humans, by the extinction of the autoimmune response when the target antigens are eliminated and, in animals, by the induction of an autoimmune disease upon immunization with a single autoantigen. In addition, autoantigens not only initiate and drive the autoimmune response, they also participate in its diversification. Indeed, in most if not all autoimmune diseases, the autoimmune response is directed against several antigens of the target organ [1]. This diversification is thought to progress from one antigen to another through the epitope spreading phenomenon whose cellular and molecular mechanisms still remain obscure [2]. Identification of the different target antigens of the autoantibody response is thus an important step in both human and experimental autoimmune diseases, and requires technologies allowing an overview of the full-blown autoantibody specificities. In this regard, we previously showed that proteomic analysis was a powerful tool to identify and characterize the different autoantibody populations produced in a spontaneous mouse model of systemic lupus erythematosus, a prototype of non-organ-specific autoimmune diseases [3].

Desmoglein 1 (Dsg1) is a 160-kDa desmosomal transmembrane glycoprotein belonging to the cadherin family. Desmosomal cadherins allow calcium-dependent cell–cell

Correspondence: Professor François Tron, Inserm U519, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 22, boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex 1, France
E-mail: francois.tron@chu-rouen.fr
Fax: +33-2-3288-8186

Abbreviations: Dsg, desmoglein; **rEC1/5-Dsg1**, recombinant extracellular domain of human desmoglein 1; **PF**, pemphigus foliaceus; **EC**, extracellular; **PNP**, paraneoplastic pemphigus; **i.p.**, intraperitoneal; **IIF**, indirect immunofluorescence; **IRF**, infrared fluorescence; **PS**, signal sequence and propeptide

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

adhesion through homophilic interactions of their extracellular (EC) domains [4]. Dsg1 expression is restricted to stratified squamous epithelia, like the epidermis [5], where its function is critical for keratinocyte adhesion mediated by desmosomes. Dsg1 is the autoantigen of pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune blistering skin disease characterized by an autoantibody response directed against conformational calcium-dependent epitopes of the Dsg1 EC domain, particularly the N-terminal adhesive region (EC1 and EC2 domains) [6–8]. Anti-Dsg1 autoantibodies are pathogenic because, when transferred into normal mice, their *in vivo* binding to Dsg1 leads to the loss of adhesion between keratinocytes and the formation of intraepidermal blisters [9]. The production of anti-Dsg1 antibodies is not restricted to PF. Indeed, solid-phase ELISAs using recombinant Dsg1, which are more sensitive than immunoblot analysis of epidermal extract, allowed the presence of these antibodies to be demonstrated in other forms of pemphigus, including pemphigus vulgaris and paraneoplastic pemphigus (PNP) [10, 11]. The tolerance breakdown observed in pemphigus may also involve other keratinocyte autoantigens [10–12]. For example, immunoblot analysis of normal human epidermal extracts with PNP sera showed that they consistently react with a doublet of 210- and 190-kDa proteins identified, respectively, as envoplakin and periplakin, which are members of the plakin family and components of the intracytoplasmic plaque of desmosomes. This reactivity pattern is highly sensitive and specific for PNP, while it is very uncommon in pemphigus vulgaris, PF and endemic PF sera [13–15]. Taken together, these observations indicate the diversification and the overlapping distribution of autoantibody responses observed in the course of these different varieties of autoimmune blistering skin diseases.

Here, we show by proteomic analysis that: (i) mice immunized with the recombinant baculoprotein corresponding to the EC domain of human Dsg1 (rEC1/5-Dsg1) developed autoantibodies directed against not only Dsg1 but also other epidermal antigens; (ii) these antigens were identified as envoplakin and periplakin; (iii) the antigen-induced autoantibody specificities were similar to those observed in certain varieties of human pemphigus; and (iv) this technology constitutes an appropriate approach to study the diversity of the autoantibody response in autoantigen-induced autoimmunity.

2 Materials and methods

2.1 Mice and immunization

Eight-week-old BALB/c and CD1 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Ten mice, five of each strain, were injected intraperitoneally (i.p.) with purified rEC1/5-Dsg1. Mice were primed with rEC1/5-Dsg1 (20 μg) emulsified in complete Freund adjuvant and boosted six times, every 10 days for 2 months with rEC1/5-Dsg1 in incomplete Freund's adjuvant. Finally, mice were boosted daily for 3 consecutive days with soluble rEC1/5-Dsg1 just before the fusion procedure. Control mice were immunized with irrelevant autoantigens, six with B23-nucleophosmin [3] and ten with myelin oligodendrocyte glycoprotein. IgG anti-Dsg1 were detected by rEC1/5-Dsg1 ELISA, immunoblotting on purified rEC1/5-Dsg1 baculoprotein or human epidermis as the substrates, and indirect immunofluorescence (IIF) on human foreskin and mouse esophagus.

2.2 Plasmid constructs

Total RNA was extracted from human peripheral blood mononuclear cells (10^7 cells) using TRIzol reagent (Life Technologies, Eragny, France). The cDNA was obtained by transcription of oligo (dT)-primed RNA by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies). A DNA fragment encoding the signal sequence and propeptide (PS) of human Dsg1 was amplified from the cDNA by nested PCR using PS sense (PSS) and reverse (PSR) as external primers and PS-*Bam*H I and PS-*Hin*d/*Pfl*23 II as internal primers. The purified PCR product was cloned into pGEM4Z vector (Promega, Madison, WI, USA) at the *Bam*H I/*Hin*d III sites. A synthetic oligonucleotide corresponding to restriction site *Pfl*23 II, FLAG tag (DYKDDDDK), hexahistidine (His) tag, stop codon and restriction site *Hin*d III was inserted between *Pfl*23 II and *Hin*d III sites to construct cassette vector, pGEM–PS–TAG. This plasmid allows the cloning of different domains of the *DSG1* gene. A cDNA fragment coding EC domains 1–5 (EC1–EC5) of Dsg1 (rEC1/5-Dsg1) was obtained by nested PCR using primers located at the 5' end of the nucleotide sequence encoding EC1 and at the 3' end that encodes EC5, flanked by *Pfl*23 II site and cloned into *Pfl*23 II-digested pGEM–PS–TAG. The *Bam*H I–*Hin*d III fragment of the resultant plasmid was inserted into the *Bgl* II/*Hin*d III sites of p119 transfer vector [16] for baculoviral expression.

2.3 Synthesis of rEC1/5-Dsg1 in baculovirus expression system

To generate recombinant baculovirus, 4×10^6 Sf9 insect cells were co-transfected with 500 ng viral DNA AcSLp10 and 5 μg pB rEC1/5-Dsg1 using the lipofection method (DOTAP, Boehringer, Mannheim, Germany) [17]. Recombinant baculoviruses were isolated by plaque purification as previously described [18]. For large-scale expression of rEC1/5-Dsg1, 5×10^8 Sf9 cells were infected for 1 h in 20 mL containing recombinant baculovirus at a multiplicity of infection units/cell (MOI) of 1, then transferred into a 1-L spinner flask containing 480 mL of Sf900 II medium (Life Technologies) and maintained in culture at 28°C. At 96 h post infection, cells were pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 15 min and the supernatant was collected and stored at −80°C until purification.

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

2.4 Purification of rEC1/5-Dsg1

FLAG-tagged rEC1/5-Dsg1 was layered onto a 5-mL column of anti-FLAG affinity gel equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 (TBS), 30 μg/mL E64 (Roche, Mannheim, Germany), 10 μg/mL leupeptin and 10 μg/mL pepstatin. The column was washed with 40 mL TBS and the bound proteins were eluted with 15 mL TBS containing the FLAG octapeptide (0.1 mg/mL). Eluted proteins were separated by SDS–PAGE in 10% separating gels, and were either transferred onto NC membranes followed by Western blot analysis with an anti-FLAG mAb to monitor protein production or stained with CBB G-250 (Sigma) to check the protein purity. The final concentration (750 μg/mL) was determined by the Bradford method using Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.5 Cell fusion

Spleen cells from immunized mice were collected 4 days after the last i.p. injection of purified rEC1/5-Dsg1 and fused with the non-secreting SP2/O myeloma cell line as previously described [19]. Hybridomas were selected based on the capacity of their supernatants to react with rEC1/5-Dsg1 in a solid-phase ELISA and to bind to human epidermis, as assessed by IIF and immunoblot experiments.

2.6 rEC1/5-Dsg1 ELISA

The wells of 96-well microtiter plates (Maxisorb Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100 μL purified rEC1/5-Dsg1 (10 μg/mL) and processed as described previously [20]. Hybridoma supernatants (1:2), mouse sera (1:50) or mAbs (1:100) were added and incubated for 1 h at room temperature. After washing, the plates were incubated with 2000-fold–diluted phosphatase alkaline-conjugated goat anti-mouse IgG (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) for 1 h at room temperature. The plates were washed and labeling was revealed by adding 100 μL *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma). Absorbance was determined at 405 nm with an ELISA reader (Labosystems, Les Ulis, France). Preimmune mouse sera ($n = 10$) were included in each experiment.

2.7 Indirect immunofluorescence assay

Mouse sera (1:25) or mAbs (1:100) were analyzed by IIF on human foreskin and mouse esophagus sections using FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies (Sigma) as the tracer. Sections were examined using a fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany).

2.8 Immunoblot analysis

Mammary surgery specimens of normal human skin were used as the source of epidermis. Proteins were extracted, separated by 1-D PAGE and blotted onto NC membranes as previously described [20]. The filters were then saturated and incubated with mouse serum (1:50), hybridoma supernatant (1:2) or mAbs (1:100) in PBST-5% dry milk for 2 h. After washing, filters were incubated for 1 h with 1:80 000-diluted peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma) in PBST–5% dry milk. For IgG-subclass determination, biotin-conjugated rabbit anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG3 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used and incubated with peroxidase-conjugated streptavidin (1:500) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) for 30 min. The filters were washed and revealed by chemiluminescence reaction (ECL™, Amersham). Some experiments were performed using infrared fluorescence (IRF) immunoblot analysis. Membranes were saturated overnight at 4°C with blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) diluted in TBS (1:2), then incubated simultaneously with human serum (PNP or PF) (1:200) and mAb (10A1 or CK1) (1:100) for 2 h. After washing with TBS–0.1% Tween 20, the membranes were incubated simultaneously with biotin-conjugated goat anti-human IgG (Caltag Laboratories) and Alexa Fluor® 680-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) (1:6000) for 1 h. Finally, after washing, membranes were incubated for 1 h with IRDye 800-conjugated streptavidin (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) (1:6000), washed and examined with the Odyssey™ Infrared Imaging system (LI-COR).

2.9 2-DE

Human epidermis was ground with a liquid nitrogen-cooled mortar and pestle, and the resulting powder was resuspended in acetone, 10% TCA, 0.12% DTT to remove residual salts coming from the 1 M NaCl solution that was used to separate the epidermis from the dermis. The suspension was incubated overnight at −20°C and then centrifuged at $15\,000 \times g$ for 30 min (4°C). The pellet was resuspended in acetone, 0.2% DTT and incubated for 1 h at −20°C. The suspension was centrifuged at $15\,000 \times g$ for 30 min (4°C), and proteins were extracted from the dried pellet as previously described by Rabilloud and Chevallet [21]. Briefly, the powdered epidermis was resuspended in 1 volume of 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.25 mM sucrose and 4 volumes of 9.6 M urea, 5% CHAPS, 25 mM spermine, 50 mM DTT. The suspension was incubated at room temperature for 1 h and then ultracentrifuged at $250\,000 \times g$ for 1 h (4°C). The protein-containing supernatant was removed and then subjected to 2-DE. The first dimension was carried out on ReadyStrip™ IPG strips (11 cm, non-linear pH 3–10 gradients; Bio-Rad Laboratories) that were rehydrated for 16 h in 200 μL rehydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 1% DTT, a trace of bromophenol blue, 0.2% Bio-Lyte ampholytes 3–10; Bio-Rad Laboratories) or in 200 μL protein extract mixed with rehydration buffer (1:2). For IPG strips that were rehydrated without protein extract, the protein solution (90 μL) was applied on the basic extremity of rehydrated IPG strips (near the cathode) or on the acid extremity of rehydrated IPG strips

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

(near the anode) using the cup loading tray for the Protean® IEF cell system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. For IEF, the Protean® IEF cell was used at 20°C with fast voltage ramping at a maximum voltage of 6000 V for 20 h. After IPG strip equilibration, the second dimension was run on 3–8% Criterion™ XT precast gel (11 cm × 8 cm × 1 mm) (Bio-Rad) using the Criterion® Dodeca™ Cell system (Bio-Rad). BenchMark™ pre-stained protein ladder (Invitrogen) was used as molecular weight standard in the second dimension step. Finally, gels were either transferred onto NC membranes or stained with CBB G-250 (Sigma). CBB-stained 2-DE gels were scanned, digitalized with 2-D phoretix software (Alphelys, Plaisir, France) and compared with the immunoblotted replica to localize the recognized protein spots.

2.10 Protein identification

The immunoreactive spots were excised from polyacrylamide gels with Ettan Spot Picker (Amersham) and digested by trypsin (proteomics grade, Sigma) with Ettan Digester (Amersham). Peptides were rehydrated with 50% ACN, 0.1% TFA and mixed on the MALDI-TOF target (Applied Biosystems) with an equal matrix volume of 7.5 mg/ml CHCA (LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France) saturated with 50% ACN, 0.1% TFA. Samples were analyzed by MS with an MALDI-TOF Voyager-DE™ PRO (Applied Biosystems) using a delayed ion extraction and ion mirror reflector mass spectrometer. The instrument settings were: reflector mode with positive polarity, 100 ns delay extraction time, 70–80% grid voltage and 20 000 V accelerating voltage. Laser shots at 500 per spectrum were used to acquire 1 spectrum with a mass range of 700–4000 Da. External calibration was carried out using the Proteomix–Peptide calibration Mix4 (LaserBio Labs). Spectra were accumulated manually from different acquisitions to improve resolution and S/N ratio. Spectra obtained were compared to those registered in protein databases (Swiss-Prot) using the Aldente program (Expasy server). The identification of immunoreactive spots was performed in triplicate.

2.11 Screening of a λgt11 expression library

A human keratinocyte λgt11 expression library was purchased from Clontech Laboratories (Palo Alto, CA). Recombinant phages were screened at a density of 3×10^7 PFU/mL. The plates were incubated at 42°C for 4 h, overlaid with NC membranes saturated with isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG) and further incubated for 4 h at 37°C. Membranes were saturated with PBS–5% dry milk at 4°C overnight and incubated with hybridoma supernatants (1:2) for 2 h at room temperature. After washing with PBST, membranes were incubated for 1 h with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG, washed and labeling was revealed by chemiluminescence reaction.

cDNA inserts from positive clones were amplified by PCR directly on the plaque with a set of primers situated around the *Eco*R I cloning site: 5'-GAC TCC TGG AGC CCG-3'; 3'-CGC GGC CAG CGA TGG-5' (Eurogentec, Seraing, Belgium). The purified PCR product was sequenced with an automated sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the same primers as for the PCR. Sequences were aligned and analyzed using the GenBank/EMBL databases (NCBI/BLAST network service).

3 Results

3.1 Characterization of the autoantibody response induced in Dsg1-immunized mice

The EC1/5-Dsg1 construct was sequenced and shown to match exactly with the canonical sequence. rEC1/5-Dsg1 was secreted into the culture supernatant of infected Sf9 cells, affinity purified and subjected to immunoblotting with anti-FLAG mAb. rEC1/5-Dsg1 was detected at 75 kDa (data not shown). All BALB/c and CD1 mice, five of each, immunized with rEC1/5-Dsg1, produced IgG reacting with rEC1/5-Dsg1 in a solid-phase ELISA (Fig. 1A). By immunoblot analysis, BALB/c and CD1 mouse sera reacted with rEC1/5-Dsg1 (Fig. 1B) and with Dsg1 that is present as a 160-kDa protein in human epidermis extract and recognized by a PF serum (Fig. 1C). This analysis showed that CD1 mouse 2 serum also bound to a 190–210-kDa doublet and BALB/c mouse 2 serum to an additional 190-kDa epidermal protein (Fig. 1C, lanes C2 and B2). By IIF, most of these mouse sera stained not only human epidermis but also mouse esophagus sections with an intercellular labeling pattern (Fig. 1D), indicating that they contained IgG directed against mouse stratified epithelium antigens. In contrast, none of the control sera obtained from mice immunized with either B23-nucleophosmin ($n = 6$) or myelin oligodendrocyte glycoprotein ($n = 10$), bound human or mouse epithelial cells by IIF or desmosome autoantigens by immunoblotting (data not shown).

Hybridomas were generated from the splenocytes of two anti-Dsg1 antibody-positive mice (BALB/c mouse 1 and CD1 mouse 1). Three (1N5, 1D8 and 8C3), selected based on the capacity of their supernatants to react with rEC1/5-Dsg1 by ELISA (Fig. 1A), were subsequently cloned; their immunological properties are summarized in Table 1. By IIF on human foreskin sections, all three mAbs bound to the intercellular space of human epidermis with a labeling pattern similar to that obtained with PF serum (Fig. 1D). Immunoblot analysis showed that 1N5 and 1D8 bound to rEC1/5-Dsg1 (Fig. 1B), and to Dsg1 protein present in human epidermal extract and recognized by PF serum, while 8C3 that derived from BALB/c mouse 1 did not (Fig. 1C). This observation suggests that the latter is directed against a conformational epitope of Dsg1 as much as the use of higher concentration of anti-Dsg1 IgG in 8C3 supernatant did not

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

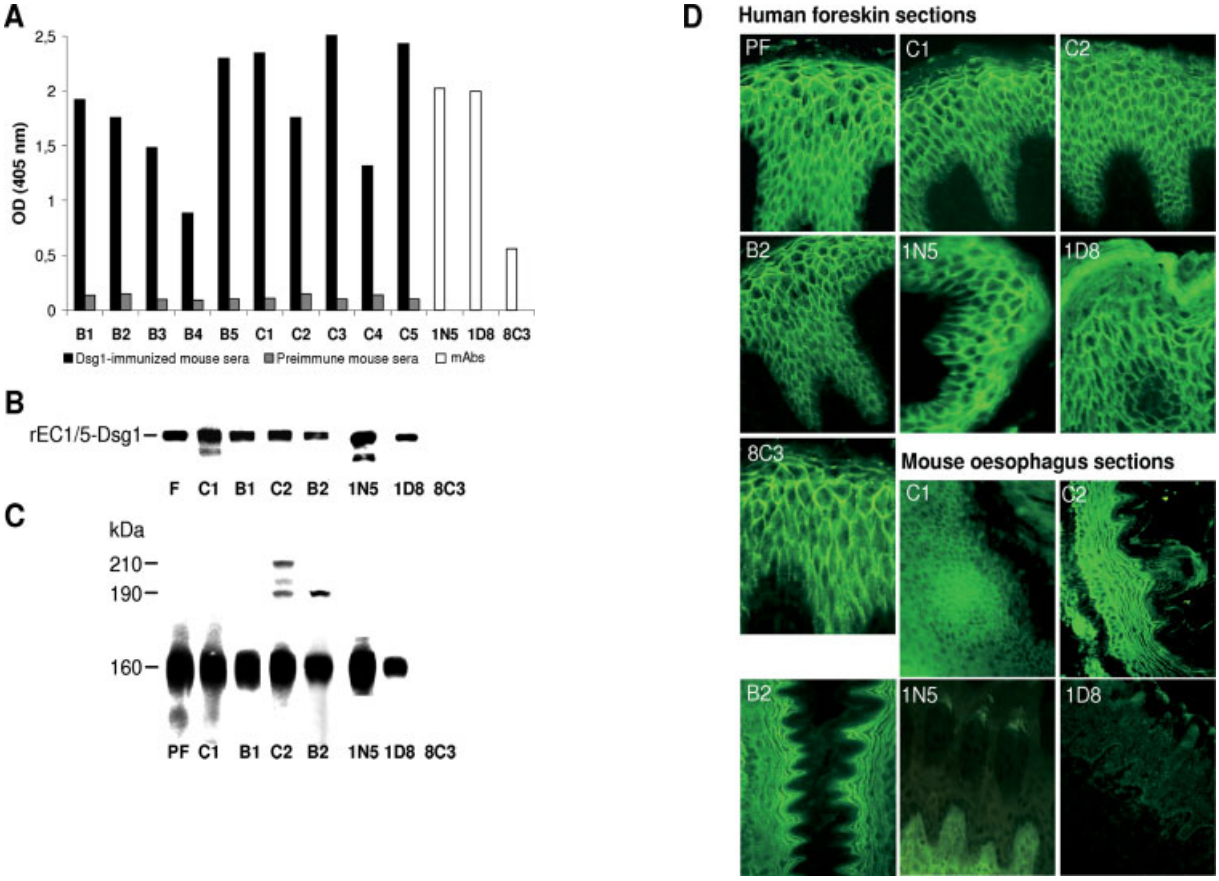


Figure 1. Binding capacities of Dsg1-immunized mouse sera and anti-Dsg1 mAbs. (A) rEC1/5-Dsg1 ELISA: rEC1/5-Dsg1-coated (1 μg) ELISA plates were saturated, incubated with mouse serum (1:50) or hybridoma supernatants (1:2) followed by phosphatase alkaline-conjugated goat anti-mouse IgG, and revealed by adding *p*-nitrophenyl phosphate. Absorbance was determined at 405 nm. B = BALB/c mice, C = CD1 mice. Immunoblot analysis on rEC1/5-Dsg1 (B) or human epidermis extract (C). Saturated filters were incubated with mouse serum (1:50) or hybridoma supernatants (1:2), followed by peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG, and revealed by chemiluminescence reaction. Anti-Flag mAb (F) or pemphigus foliaceus serum (PF) were used as controls in (B) and (C), respectively. Molecular masses are indicated on the left. The detection of the intermediate band at approximately 200 kDa (C, lanes C2) was not reproducible. (D) IIF assays on human foreskin and mouse esophagus sections. Tissue sections were incubated with mouse sera (1:25) or hybridoma supernatants (1:2), washed and incubated with FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies (magnification ×400). CD1 mouse 1 (C1), CD1 mouse 2 (C2), BALB/c mouse 2 (B2) as well as all three mAbs (1N5, 1D8 and 8C3) gave an intercellular labeling pattern of human epidermis similar to that obtained with an anti-Dsg1-positive PF serum. On mouse esophagus sections, the three mouse sera also gave an intercellular staining; 1N5, 1D8 and 8C3 did not bind to the tissue sections (8C3 is not shown).

Table 1. Immunological characterization of mAbs derived from normal mice immunized with the extracellular domain of Dsg1

mAb	Isotype	ELISA	IIF assay		Immunoblotting	
			Human skin	Mouse esophagus	rEC1/5-Dsg1	Human epidermis (kDa)
1N5	IgG1	+	IC	−	+	160
1D8	IgG1	+	IC	−	+	160
8C3	IgG3	+	IC	−	−	−
CK1	IgG1	−	IC+BM	IC+BM	−	190–210
10A1	IgG3	−	IC	IC	−	190

IC: intercellular labeling; BM: basement membrane labeling.

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

permit the revelation of its binding to Dsg1 by immunoblot analysis (data not shown). In contrast to the corresponding mouse sera (CD1 mouse 1), 1N5 and 1D8 did not bind to mouse esophagus sections (Fig. 1D).

Two hybridomas, CK1 and 10A1, were derived from CD1 mouse 2 and BALB/c mouse 2, respectively, whose sera reacted with other epidermal antigens in addition to Dsg1. They were selected by IIF and cloned. CK1 gave both basement membrane and intercellular labeling of human and mouse sections by IIF (Fig. 2A). By immunoblotting on human epidermis, CK1 recognized a doublet of 190- and 210-kDa proteins, which was identical to that bound by the parental mouse serum. This doublet was also recognized by PNP sera, as demonstrated by the IRF immunoblot analysis (Fig. 2B) (Table 1). 10A1 gave an intercellular labeling pattern of human foreskin and mouse esophagus by IIF (Fig. 2A) and recognized a unique 190-kDa protein on the human epidermal extract immunoblot, which comigrated with the 190-kDa polypeptide consistently detected by the PNP serum (Fig. 2B).

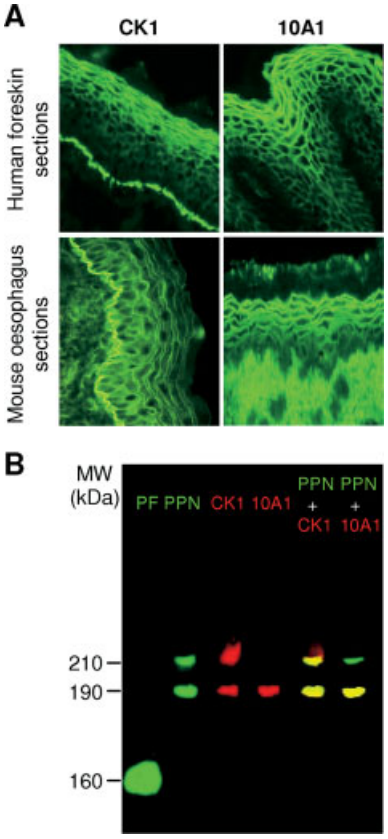


Figure 2. Characterization of mAbs directed against other epidermal antigens. (A) IIF assays on human foreskin and mouse esophagus sections of CK1 and 10A1. CK1 and 10A1 gave an intercellular labeling pattern of the epidermis but CK1 also labeled the basement membrane of the dermoepidermal junction. (magnification ×400). (B) IRF immunoblot analysis of CK1 and 10A1 on human epidermis. Saturated filters were incubated simultaneously with hybridoma supernatant and PNP serum, and, after washing, simultaneously with biotin-conjugated goat anti-human IgG and Alexa Fluor® 680-conjugated rabbit anti-mouse IgG, and finally with IRDye 800-conjugated streptavidin. Replicas were examined with the Odyssey™ Infrared Imaging system. PF, pemphigus foliaceus serum. Molecular masses are indicated on the left. The yellow bands indicate the co-labeling of red- and green-labeled proteins.

3.2 10A1 mAb recognizes periplakin, and CK1 both periplakin and envoplakin on a 2-DE human epidermis protein map

To identify the epidermal proteins targeted by 10A1 and CK1 mAbs, we carried out 2-DE of normal human epidermis extract. First, we established a 2-DE human epidermis protein map using a passive insertion of proteins into the IPG-strip during the rehydration process. This approach allowed us to visualize the 190-kDa protein in the 2-DE gel stained by CBB G-250 (Fig. 3A, black arrow) and to show that the 190-kDa protein was bound by both 10A1 and CK1 mAbs (data not shown). However, in the 2-DE gel, the density of the 190-kDa protein spot was weak and the 210-kDa protein could not be visualized due to the limited protein loading capacities of the IPG 2-DE method for proteins of high molecular masses. Therefore, to increase the entry of high molecular weight proteins into the IPG-strip, proteins were actively inserted during IEF process by loading the epidermal extract at the basic extremity of the IPG strip. This method facilitates the entry of high molecular weight proteins into the IPG-strip and thus, increases the density of spots detected in the CBB-stained 2-DE gel. Accordingly, and by using 10A1 to immunoscreen this 2-DE human epidermis protein map (Fig. 3C), the immunoreactive protein was visualized as a triplet on the 2-DE gel stained by CBB G-250 (Fig. 3B) and analyzed by MALDI-TOF MS. The comparison of the mass spectra obtained for each spot of the protein triplet with those contained in Swiss-Prot database allowed us to identify, with high probability, the 190-kDa protein as human periplakin, thereby demonstrating that periplakin is the target of 10A1 (Table 2).

The same approach was used in a second series of experiment to identify the 190- and 210-kDa proteins bound by CK1. The mAb consistently reacted with a protein spot that had co-ordinates identical to those of the 190-kDa protein recognized by 10A1 and identified as periplakin (Fig. 3C). MS analysis of the protein excised from the 2-DE gel run in parallel confirmed that the 190-kDa protein was periplakin. CK1 also bound to a stretch of 210-kDa protein spots with different p*I* (Fig. 3C). These spots were visualized on the 2-DE gel stained by CBB G-250 (Fig. 3B). MS analysis of the 210-kDa proteins (four spots excised from the 2-DE gel) identified this protein stretch as human envoplakin (Table 2), indicating that CK1 reacted with both periplakin and envoplakin.

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 2. Identities of epidermal proteins reacting with 10A1 and CK1

Spot no.[a)]	Protein identity	Accession no.	Theoretical Mol. mass (kDa)/p*I*	Peptide matches	Sequence coverage	*p* value
1	Periplakin	gi|14195005|sp|O60437|	205/5.5	38	24%	$1.5e^{-20}$
2	Periplakin	gi|14195005|sp|O60437|	205/5.5	39	24%	$5.2e^{-24}$
3	Periplakin	gi|14195005|sp|O60437|	205/5.5	37	20%	$1e^{-20}$
4	Envoplakin	gi|14194715|sp|Q92817|	230/6.5	21	14%	$5.2e^{-22}$
5	Envoplakin	gi|14194715|sp|Q92817|	230/6.5	27	18%	$4e^{-18}$
6	Envoplakin	gi|14194715|sp|Q92817|	230/6.5	31	20%	$1e^{-19}$
7	Envoplakin	gi|14194715|sp|Q92817|	230/6.5	28	20%	$3.9e^{-24}$

a) Protein spots were described in Fig. 3.

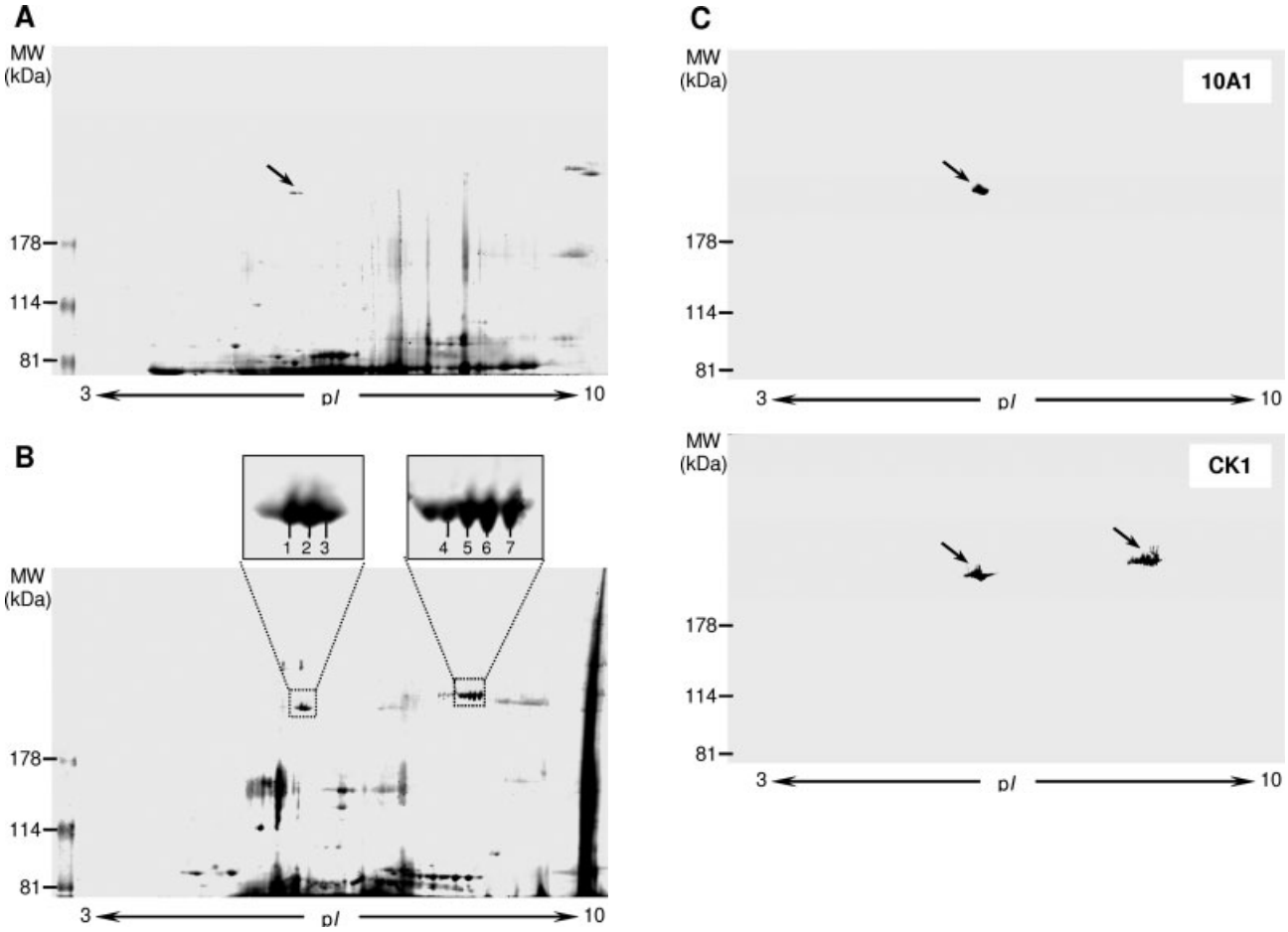


Figure 3. Immunoscreening of a 2-DE human epidermis protein map with 10A1 and CK1 mAbs. (A, B) The epidermis extract was separated by 2-DE using passive IPG strip-insertion of epidermal proteins during the rehydration process (A) or active insertion at the basic extremity of the IPG strip during IEF using the cup loading tray system (B). Gels were either electrotransferred onto NC membranes or stained with CBB G-250. (C) 10A1 and CK1 were used to immunoblot 2-DE human epidermis protein maps. Both, 10A1 and CK1 bound to a 190-kDa protein triplet and CK1 also reacted with a stretch of 210-kDa protein spots that were only visualized on the 2-DE gel performed with active insertion of proteins at the basic extremity of the strips. The immunoreactive proteins were visualized on CBB-stained 2D gels (B), excised from polyacrylamide gels, digested by trypsin and analyzed by MALDI-TOF MS. Although a single CBB-stained 2-DE gel is shown, the spots bound by 10A1 and CK1 were picked up from separate gels. Spectra obtained were compared to those registered in protein databases (Swiss-Prot) using the Aldente program (Expasy server).

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

3.3 CK1 reacted with the linker subdomain of envoplakin

While we were setting up the experimental conditions of the 2-DE gel procedure to identify the CK1 protein targets, we immunoscreened in parallel a λgt11 human keratinocyte cDNA expression library. Approximately 10^6 clones from the λgt11 library were screened with CK1. Immunoreactive clone LC6, was repeatedly recognized by CK1 after five rounds of amplification, and selected. PCR amplification of the cDNA insert, using a pair of λgt11 cloning primers, revealed that LC6 carried a 486-bp cDNA insert. Sequence analysis of this insert predicted an open reading frame of 435 bp encoding a polypeptide (145 amino acids) corresponding to the main part of the linker subdomain of human envoplakin (Fig. 4). Finally, CK1 reactivity was confirmed by immunoblotting using the recombinant envoplakin polypeptide (1687–1831) as the substrate and was identical to that given by PNP sera (data not shown).

4 Discussion

The diversification of the autoantibody response represents an important phenomenon in organ- and non-organ-specific autoimmune diseases. In most experimental models of autoimmunity so far analyzed, the characterization of this process required the successive identification of the target antigens. The development of proteomic analysis, combining 2-DE of the target organ and MS, offers the possibility to characterize the diversity of the antibody specificities in autoimmune diseases. The feasibility of this strategy was demonstrated in both human [22, 23] and experimental autoimmune diseases [3]. In particular we could identify by immunoscreening of 2-DE HL60 cell protein map several targets of autoantibodies contained in sera from (NZW × BXSB)F1 mice, which spontaneously develop systemic lupus erythematosus.

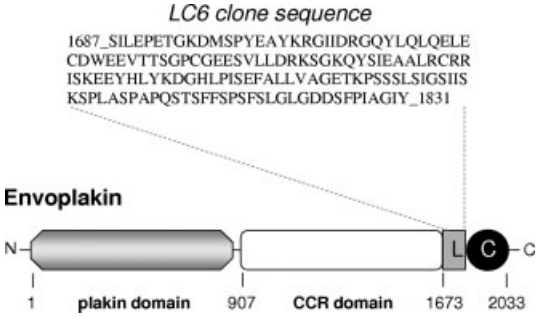


Figure 4. Identification of the protein targeted by CK1 mAb. CK1 was used to immunoscreen a λgt11 human keratinocyte cDNA expression library. Sequence analysis of the cDNA indicated that the bacterial clone (LC6) reacting with CK1 codes for a peptide of 145 amino acids corresponding to the main part of the linker subdomain (L) of human envoplakin. CCR: coiled-coil rod (domain).

Here we extended this observation to autoantigen-induced organ-specific autoimmunity by showing that the immunoscreening of 1-DE and 2-DE gels of epidermal extract with sera from mice immunized with a single autoantigen led to characterization of the different specificities of the induced autoantibody response. BALB/c and CD1 mice were immunized with rEC1/5-Dsg1, which led to the production of IgG anti-Dsg1 in all mice. These antisera reacted with rEC1/5-Dsg1 in a solid-phase ELISA and bound to a 160-kDa protein in 1-DE gel of epidermal extract, also recognized by PF serum. Three mAbs were derived from mice that developed antibodies to only Dsg1 and were shown to be selectively directed against Dsg1. Their immunochemical properties reflected those of autoantibodies produced by PF patients that target both conformational and non-conformational Dsg1 B cell epitopes [10, 12]. Two Dsg1-immunized mice mounted an immune response against epidermal antigens other than Dsg1, as shown by immunoblot analysis of human epidermal extract. Two mAbs secreted by hybridomas derived from the spleen cells of these mice allowed us to precisely characterize the targets of this autoantibody response. Using the IRF immunoblot analysis of 1-DE with 10A1, CK1 and sera from PNP patients whose autoimmune response is characterized by a large breakage of B cell tolerance to various members of the plakin family and Dsg [15, 24], we demonstrated that CK1 and 10A1 protein targets were also recognized by autoantibodies present in PNP sera. This technology allows efficient comparison of the autoantibody specificities observed in human autoimmune diseases and their corresponding experimental models and, thus, may be usefully associated with the basic immunoproteomic approach. 10A1 reacted with a 190-kDa protein, and CK1 with a 190–210-kDa doublet. The immunoscreening of the 2-DE human epidermis protein map combined with MS enabled us to identify the 190- and 210-kDa proteins as periplakin and envoplakin, respectively.

In this regard, to increase the entry of high molecular weight proteins into the IPG strip, proteins were actively inserted during IEF using a loading of the epidermal extract at the basic (or acid) extremity of the IPG-strip. This strategy allowed the 210-kDa protein bound by CK1 to enter the IPG gel, be visualized in the CBB-stained 2-DE map, excised and finally identified by MS analysis. It also increased the quantity of 190-kDa periplakin in the CBB-stained 2-DE gel as well as its focusing, and facilitated its identification. Others have proposed the agarose 2-DE method, which has been previously shown to have higher loading capacity than 2-DE with IPG gel for IEF, and thus to resolve proteins with high molecular masses larger than 150 kDa [25, 26]. Interestingly, a recent study showed that proteomics analysis using agarose 2-DE and 2-D DIGE methods allowed the expression of periplakin to be visualized, identified and compared in peritumoral and tumoral esophageal tissue [27].

10A1 and CK1 mAbs were shown to have interesting properties. Immunoblot analysis of 2-DE human epidermis protein map combined with MS indicated that both 10A1

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

and CK1 mAbs recognized the same 190-kDa protein, periplakin. However, they reacted with different periplakin B cell epitopes since CK1 also bound to the 210-kDa envoplakin. The demonstration by immunoscreening of a λgt11 human keratinocyte cDNA expression library that CK1 recognized the linker subdomain of envoplakin explains its reactivity with the 190–210-kDa doublet. Indeed, the linker subdomain amino acid sequences of envoplakin and periplakin have 48% identity, and may exhibit cross-reactivity. Interestingly, the linker subdomain of envoplakin, which has previously been shown to be targeted by the B cell autoimmune response in the course of PNP [15], was recently demonstrated to be a major epitope recognized by PNP autoantibodies that bound the 190–210-kDa doublet [28].

CK1 and 10A1 mAbs bound to not only human epidermis but also mouse substrates, indicating that they react with B cell epitopes shared by human and mouse epidermal molecules. In this regard, one should note that the linker subdomain amino acid sequence of envoplakin recognized by CK1 is highly conserved between human and mouse (88% identity) and that human periplakin shares 76% identity with the murine molecule. Thus, cross-reactivity likely accounts for the reactivity of both mAbs with human and mouse substrates.

Whatever the mechanisms involved in the process, our observation indicates that proteomic analysis allows the diversification of the autoantibody response in normal mice upon immunization with a single autoantigen to be analyzed efficiently, and that the application of the technology to spontaneous or autoantigen-induced experimental autoimmune diseases could help to decipher the autoreactive B cell specificities and the mechanisms of B cell tolerance breakage in autoimmunity.

This work was funded by the Institut de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Hugo Mouquet is the recipient of fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie. We thank Janet Jacobson for editorial assistance.

5 References

[1] Bach, J. F., Koutouzov, S., Van Endert, P. M., *Immunol. Rev.* 1998, *164*, 139–155.

[2] Vanderlugt, C. J., Miller, S. D., *Curr. Opin. Immunol.* 1996, *8*, 831–836.

[3] Thébault, S., Gilbert, D., Hubert, M., Drouot, L. *et al.*, *J. Immunol.* 2002, *169*, 4046–4053.

[4] Amagai, M., *J. Invest. Dermatol.,* 1995, *104*, 146–152.

[5] Schafer, S., Koch, P. J., Franke, W. W., *Exp. Cell. Res.,* 1994, *211*, 391–399.

[6] Amagai, M., Ishii, K., Hashimoto, T., Gamou, S. *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 1995, *105*, 243–247.

[7] Emery, D. J., Diaz, L. A., Fairley, J. A., Lopez, A., Taylor, A. F., *J. Invest. Dermatol.* 1995, *104*, 323–328.

[8] Sekiguchi, M., Futei, Y., Fujii, Y., Iwasaki, T. *et al.*, *J. Immunol.* 2001, *167*, 5439–5448.

[9] Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K. J., Shimizu, N., Nishikawa, T., *J. Invest. Dermatol.* 1995, *104*, 895–901.

[10] Ishii, K., Amagai, M., Hall, R. P., Hashimoto, T. *et al.*, *J. Immunol.* 1997, *159*, 2010–2017.

[11] Amagai, M., Nishikawa, T., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., Hashimoto, T., *J. Clin. Invest.* 1998, *102*, 775–782.

[12] Martel, P., Joly, P., *Clin. Dermatol.* 2001, *19*, 662–674.

[13] Kazerounian, S., Mahoney, M. G., Uitto, J., Aho, S., *J. Invest. Dermatol.* 2000, *115*, 505–507.

[14] Hisamatsu, Y., Abreu Velez, A. M., Amagai, M., Ogawa, M. M. *et al.*, *J. Dermatol. Sci.* 2003, *32*, 33–41.

[15] Nagata, Y., Karashima, T., Watt, F. M., Salmhofer, W., Kanzaki, T., *J. Invest. Dermatol.* 2001, *116*, 556–563.

[16] Chaabihi, H., Ogliastro, M. H., Martin, M., Giraud, C. *et al.*, *J. Virol.* 1993, *67*, 2664–2671.

[17] Felgner, P. L., Ringold, G. M., *Nature* 1989, *337*, 387–388.

[18] Summers, M. D., Smith, G. E., *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555.* Texas Agricultural Experiment Station, College Station 1987.

[19] Gilbert, D., Margaritte, C., Payelle-Brogart, B., Tron, F., *J. Immunol.* 1992, *149*, 1795–1801.

[20] Kallel Sellami, M., Ben Ayed, M., Mouquet, H., Drouot, L. *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 2004, *137*, 195–200.

[21] Rabilloud, T., Chevallet, M., in: Rabilloud, T. (Ed.), *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*, Springer-Verlag, Berlin 2000, pp. 9–29.

[22] Stulik, J., Hernychova, L., Porkertova, S., Pozler, O. *et al.*, *Proteomics* 2003, *3*, 951–956.

[23] Almeras, L., Lefranc, D., Drobecq, H., de Seze, J. *et al.*, *Proteomics* 2004, *4*, 2184–2194.

[24] Ruhrberg, C., Hajibagheri, M. A., Simon, M., Dooley, T. P., Watt, F. M., *J. Cell. Biol.* 1996, *134*, 715–729.

[25] Oh-Ishi, M., Satoh, M., Maeda, T., *Electrophoresis* 2000, *21*, 1653–1669.

[26] Oh-Ishi, M., Maeda, T., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, *771*, 49–66.

[27] Nishimori, T., Tomonaga, T., Matsushita, K., Oh-Ishi, M. *et al.*, *Proteomics* 2006, *6*, 1011–1018.

[28] Zhang, B., Zheng, R., Wang, J., Bu, D., Zhu, X., *J. Invest. Dermatol.* 2006, *126*, 832–840.

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

C- Le transcrit de la desmogléine 1 est exprimé dans le thymus humain

Afin d'éxaminer l'expression thymique du transcrit codant pour la Dsg1, nous avons collecté 32 fragments de thymus humain (T1 à T32) prélevés chez des sujets subissant une thymectomie pour une pathologie cardiovasculaire âgés de 1 jour à 60 ans (moyenne 25,3 ± 21,6 ans). Les analyses par PCR *via* l'amplification d'une séquence spécifique de l'ADNc *DSG1* montre que 29 thymus (90, 6%) expriment les ARNm *DSG1*. Pour les 3 autres thymus, la quantité d'ARN totaux extraits était faible, ce qui explique certainement l'absence d'amplification du fragment d'ADNc *DSG1*. Le séquençage des produits de PCR obtenus à partir de 5 thymus a confirmé la spécificité de l'amplication.

Les analyses par PCR quantitative en temps réel réalisées sur 9 thymus sélectionnés au hasard et couvrant différents âges (9 jours à 45 ans) indiquent que l'expression des ARNm *DSG1* augmente avec l'âge ($r = 0,83$; $P = 0,008$). En effet, l'expression relative des messagers *DSG1* est environ 1,5 fois plus élevée chez les sujets d'un âge supérieur à 14 ans comparée à ceux dont l'âge ne dépasse pas 14 ans ($P = 0,016$). Ces résultats feront l'objet d'une publication qui est en préparation.

ARTICLE 3

Transcript of Desmoglein 1, the Target Autoantigen of Pemphigus Foliaceus, is Expressed in Human Thymus

H. Mouquet, S. Berrih-Aknin, P. Joly, D. Gilbert, F. Tron

In preparation.

Transcript of Desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is expressed in human thymus[1]

Hugo Mouquet[2], Sonia Berrih-Aknin*, Pascal Joly, Danièle Gilbert and François Tron

Inserm, U519, Institut Fédératif de Recherche 23, Rouen, F-76183 France; Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rouen, F-76183 France.

*CNRS UMR 8078-Remodelage Tissulaire et Fonctionnel: Signalisation et Physiopathologie, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

Running title: Thymic expression of desmoglein 1 mRNA

Key words: Desmoglein 1, Pemphigus, Autoantigen, Thymus

[1]This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). [2]Hugo Mouquet is the recipient of fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie.

ABSTRACT

Desmoglein 1 (Dsg1) is a transmembrane glycoprotein of the desmosome allowing cell-cell adhesion between keratinocytes whose expression is restricted to stratified squamous epithelia-like epidermis. Dsg1 is the autoantigen targeted by pathogenic autoantibodies produced in the course of pemphigus foliaceus and in a way dependent on Dsg1-specific T cells. Herewith, we demonstrate that mRNA of the *DSG1* gene is present in human normal thymus and show by quantitative real-time PCR analysis that the expression of *DSG1* transcript increases with age. These data provide another illustration of the thymic expression of a tissue-specific autoantigen involved in an organ-specific autoimmune disease, which may participate in the T-cell tolerance acquisition.

Introduction

T-cell tolerance to self-antigens is acquired in both thymus (central tolerance) and peripheral lymphoid organs (peripheral tolerance) through various and complex mechanisms. The T-cell repertoire expressed in periphery depends on positive and negative selections that take place in the thymus. Lymphocytes that interact through their TCR with a low to medium affinity with self-peptides-MHC complex are positively selected whereas those with a high affinity undergo clonal deletion (negative selection). Thus, the self-antigen diversity expressed by antigen presenting cells (APC) which are accessible to immature T-cells will determine the extend and specificity of the T-cell repertoire. Until recently, it was generally thought that central tolerance did not comprise tissue-restricted self-antigen presentation. However, this view was challenged by several important papers which demonstrated that a broad set of tissue-specific antigens is physiologically expressed in human thymus (1, 2). In particular, several major target autoantigens of various autoimmune diseases such as acetylcholine receptor (3), insulin (4, 5) or myelin basic protein (6, 7) were shown to be expressed in human thymus.

Desmogleins (Dsg) consist of 4 different transmembrane glycoproteins belonging to the desmosomal cadherin family (Dsg1 to Dsg4) and allowing a calcium-dependent cell-cell adhesion critical for desmosomal junction. Dsg2 is detected in all desmosome-possessing tissues whereas Dsg1 and Dsg3 are restricted to stratified squamous epithelia-like epidermis (8). Dsg1 is the autoantigen of pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune blistering skin disease characterized by a pathogenic autoantibody response directed against epitopes of the Dsg1 extracellular domains that leads to a loss of adhesion between keratinocytes and the formation of intraepidermal blisters (9). The production of anti-Dsg1 antibodies is dependent on Dsg1-specific T cells which are detected in PF patients (10).

To get insight into the mechanisms involved in tolerance breakdown against Dsg1, we

asked whether transcript of Dsg1 is expressed in human normal thymus.

Results and Discussion

To examine the mRNA expression of *DSG1* gene in human thymus, we collected fresh thymic fragments (T1 to T32) obtained from 32 subjects undergoing cardiac surgery. Their age ranged from 1 day to 60 years (mean 25.3 ± 21.6 years) (Table I). cDNAs were obtained by transcription of random-primed RNAs which were extracted from human thymuses. PCR analysis using *DSG1*-specific primers showed that 29 thymus samples (90.6%) expressed human *DSG1* transcripts (Table I and Figure 1). The absence of *DSG1*-amplification in 3 thymus samples (T27, T29 and T31) was likely due to a limited amount of extracted total RNAs. Amplified cDNA fragments obtained from 5 thymic samples were sequenced and shown to match exactly with the canonical sequence of *DSG1* cDNA.

These data are reminiscent of those previously reported indicating that certain tissue-restricted autoantigens are expressed in human thymus, particularly those targeted in the course of antibody-mediated autoimmune diseases such as acetylcholine receptor (3), TSH receptor (11) or α3 chain of type IV collagen (12). More closely, mRNA encoding the pemphigus vulgaris autoantigen, Dsg3, has been shown to be expressed in human thymus (8, 13). The demonstration of the *DSG1*-transcription in human thymus suggests that Dsg1-derived peptides could be presented to T cells maturing in the thymus leading to either autoreactive T-cell deletion or regulatory T-cell development. Nevertheless, since Dsg1-reactive T cells have been identified not only in PF patients but also in healthy subjects at similar frequency (14), thymic expression of Dsg1 does not necessarily result in clonal deletion of Dsg1-specific T cells. Thus, it can hypothesize that Dsg1 expression in human thymus promotes positive selection of regulatory T cells rather than negative selection of effector T cells. In this regard, Dsg3-specific Tr1 regulatory

T-cells expressing Foxp3 molecule, probably involved in the maintenance of tolerance against Dsg3, were shown to be less frequently detected in pemphigus vulgaris patients than in controls (15).

In order to examine interindividual variations of *DSG1*-transcript expression, quantitative real-time PCR were then carried out on 9 randomly-selected human thymus samples isolated from donors at different ages (9 days to 42 years) (Figure 2*A*). Figure 2*B* shows the relative expression of *DSG1* mRNA according to age and indicates that *DSG1*-transcript expression increased with age (Spearman r = 0.83, P = 0.008). Relative expression of *DSG1* mRNA was approximately 1.5-fold higher in normal individuals over 14 years than in subjects under 14 years (P = 0.016) (Figure 2*C*). In contrast to what was observed for several autoantigens expressed in human thymus at mRNA level whose interindividual variability was shown to be unrelated to age (6), the thymic expression of *DSG1* transcript was clearly shown to be age-dependent. This is surprising in comparison to the number decrease of thymic cells with age-related thymic involution, in particular APC, which could present autoantigen-derived peptides to maturing T-cells. Indeed, reductions of thymic epithelial spaces and dendritic cell number represent typical features of thymic involution (16, 17). Although the precise mechanism underlying the increased *DSG1*-mRNA expression in human thymus remains obscure, we could hypothesize that the number of certain thymic cells endowed with APC properties and expressing *DSG1* transcript could increase with age. In this respect, in spite of an overall decrease of cellular density in human thymus with its involution, one should note that the number of thymic B cells have been shown to be increased with age (18, 19).

References

1. Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol 2:1032*.
2. Sospedra, M., X. Ferrer-Francesch, O. Dominguez, M. Juan, M. Foz-Sala, and R. Pujol-Borrell. 1998. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol 161:5918*.
3. Wakkach, A., T. Guyon, C. Bruand, S. Tzartos, S. Cohen-Kaminsky, and S. Berrih-Aknin. 1996. Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. *J Immunol 157:3752*.
4. Pugliese, A., M. Zeller, A. Fernandez, Jr., L. J. Zalcberg, R. J. Bartlett, C. Ricordi, M. Pietropaolo, G. S. Eisenbarth, S. T. Bennett, and D. D. Patel. 1997. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet 15:293*.
5. Vafiadis, P., S. T. Bennett, J. A. Todd, J. Nadeau, R. Grabs, C. G. Goodyer, S. Wickramasinghe, E. Colle, and C. Polychronakos. 1997. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet 15:289*.
6. Bruno, R., L. Sabater, M. Sospedra, X. Ferrer-Francesch, D. Escudero, E. Martinez-Caceres, and R. Pujol-Borrell. 2002. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur J Immunol 32:2737*.
7. Pribyl, T. M., C. Campagnoni, K. Kampf, V. W. Handley, and A. T. Campagnoni. 1996. The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. *J Neurosci Res 45:812*.

8. Schafer, S., P. J. Koch, and W. W. Franke. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res 211:391*.

9. Mouquet, H., D. Gilbert, P. Musette, F. Tron, and P. Joly. 2005. [Molecular advances in pathogenesis of autoimmune blistering skin diseases]. *Ann Dermatol Venereol 132:231*.

10. Lin, M. S., C. L. Fu, V. Aoki, G. Hans-Filho, E. A. Rivitti, J. R. Moraes, M. E. Moraes, A. M. Lazaro, G. J. Giudice, P. Stastny, and L. A. Diaz. 2000. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Clin Invest 105:207*.

11. Murakami, M., Y. Hosoi, T. Negishi, Y. Kamiya, K. Miyashita, M. Yamada, T. Iriuchijima, H. Yokoo, I. Yoshida, Y. Tsushima, and M. Mori. 1996. Thymic hyperplasia in patients with Graves' disease. Identification of thyrotropin receptors in human thymus. *J Clin Invest 98:2228*.

12. Wong, D., R. G. Phelps, and A. N. Turner. 2001. The Goodpasture antigen is expressed in the human thymus. *Kidney Int 60:1777*.

13. Tsunoda, K., T. Ota, H. Suzuki, M. Ohyama, T. Nagai, T. Nishikawa, M. Amagai, and S. Koyasu. 2002. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. *Eur J Immunol 32:627*.

14. Gebhard, K. L., C. M. Veldman, R. Wassmuth, E. Schultz, G. Schuler, and M. Hertl. 2005. Ex vivo analysis of desmoglein 1-responsive T-helper (Th) 1 and Th2 cells in patients with pemphigus foliaceus and healthy individuals. *Exp Dermatol 14:586*.

15. Veldman, C., A. Hohne, D. Dieckmann, G. Schuler, and M. Hertl. 2004. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol 172:6468*.

16. Bertho, J. M., C. Demarquay, N. Moulian, A. Van Der Meeren, S. Berrih-Aknin, and P. Gourmelon. 1997. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol 179:30*.

17. Nakahama, M., N. Mohri, S. Mori, G. Shindo, Y. Yokoi, and R. Machinami. 1990. Immunohistochemical and histometrical studies of the human thymus with special emphasis on age-related changes in medullary epithelial and dendritic cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 58:245*.

18. Flores, K. G., J. Li, and L. P. Hale. 2001. B cells in epithelial and perivascular compartments of human adult thymus. *Hum Pathol 32:926*.

19. Weerkamp, F., E. F. de Haas, B. A. Naber, W. M. Comans-Bitter, A. J. Bogers, J. J. van Dongen, and F. J. Staal. 2005. Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. *J Allergy Clin Immunol 115:834*.

20. Mouquet, H., S. Farci, P. Joly, L. Drouot, J. Leblond, J. Leprince, M. C. Tonon, P. Loiseau, D. Charron, B. Maillère, F. Tron, and D. Gilbert. 2006. A truncated alternative spliced isoform of human desmoglein 1 contains a specific T-cell epitope binding to the pemphigus foliaceus-associated HLA class II DRβ1*0102 molecule. *J Immunol 177:* (In press).

Tableau I. *DSG1*-mRNA expression in human thymus

Thymus	Age	Sex	PCR amplification		Relative expression of *DSG1* mRNA
			GAPDH	*DSG1*	
T1	1 day	F	+	+	*ND*
T2	8 days	F	+	+	*ND*
T3	9 days	F	+	+	53.5
T4	1 month	F	+	+	*ND*
T5	2 months	F	+	+	48.3
T6	4 months	F	+	+	*ND*
T7	11 months	F	+	+	55.9
T8	1 year	F	+	+	*ND*
T9	3 years	F	+	+	*ND*
T10	5 years	F	+	+	*ND*
T11	7 years	F	+	+	52.6
T12	10 years	F	+	+	56.4
T13	11 years	F	+	+	*ND*
T14	14 years	M	+	+	81.3
T15	14 years	M	+	+	*ND*
T16	21 years	M	+	+	64.1
T17	24 years	M	+	+	*ND*
T18	31 years	M	+	+	82.6
T19	35 years	M	+	+	*ND*
T20	42 years	F	+	+	*ND*
T21	42 years	M	+	+	82.6
T22	43 years	M	+	+	*ND*
T23	44 years	M	+	+	*ND*
T24	46 years	M	+	+	*ND*
T25	46 years	M	+	+	*ND*
T26	47 years	M	+	+	*ND*
T27	48 years	*ND*	+	-	*ND*
T28	51 years	F	+	+	*ND*
T29	52 years	M	+	-	*ND*
T30	54 years	M	+	+	*ND*
T31	56 years	M	+	-	*ND*
T32	60 years	M	+	+	*ND*

ND, not determined.

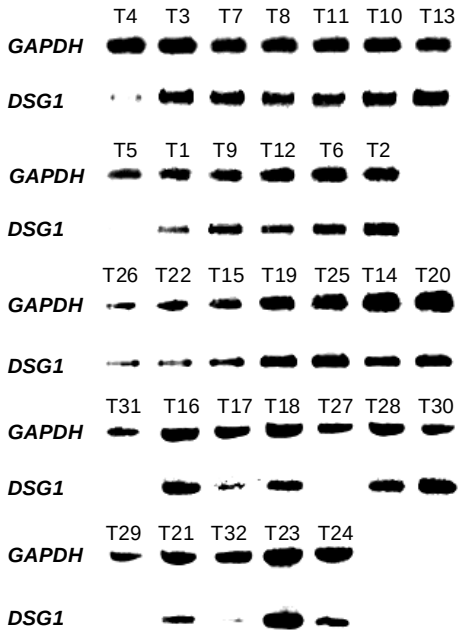

T4 T3 T7 T8 T11 T10 T13
GAPDH
DSG1
T5 T1 T9 T12 T6 T2
GAPDH
DSG1
T26 T22 T15 T19 T25 T14 T20
GAPDH
DSG1
T31 T16 T17 T18 T27 T28 T30
GAPDH
DSG1
T29 T21 T32 T23 T24
GAPDH
DSG1

FIGURE 1

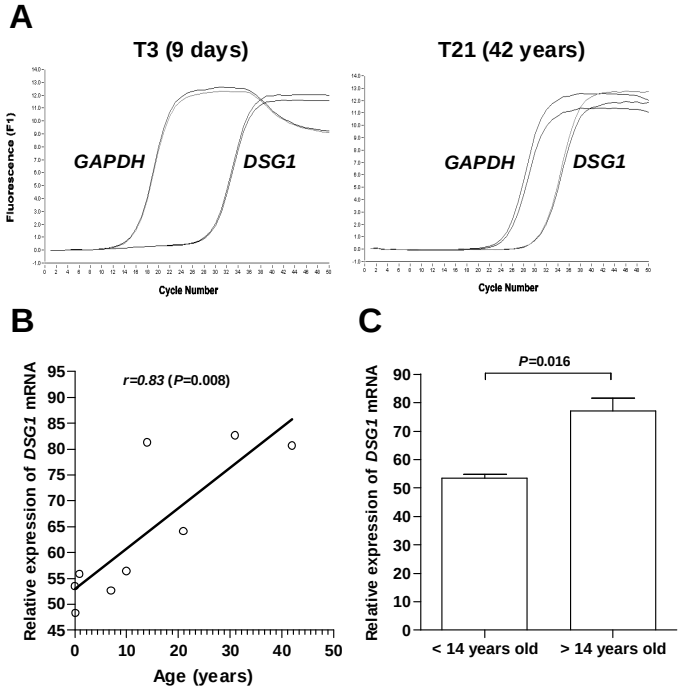

A
T3 (9 days)
T21 (42 years)
Fluorescence (F1)
GAPDH
DSG1
GAPDH
DSG1
Cycle Number
Cycle Number
B
C
r=0.83 (P=0.008)
Relative expression of DSG1 mRNA
Age (years)
P=0.016
Relative expression of DSG1 mRNA
< 14 years old
> 14 years old

FIGURE 2

Figure legends.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of *DSG1*- and *GAPDH*-amplified products of cDNAs prepared from human thymus. Fresh thymic fragments were obtained from 32 subjects (T1 to T32) undergoing cardiac surgery with an age ranging from 1 day to 60 years (mean 25.3 ± years). All donors gave written consent to participate in this study. Total RNAs were extracted from each frozen samples of normal thymus using Trizol reagent (Life technologies, Eragny, France). cDNAs were obtained by transcription of random-primed RNAs (5 µg) by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies), and then subjected to PCR amplification. Primers used to amplify specific gene products were: *GAPDH* sense, 5´-TGC CAT CAA CGA CCC CTT CA-3´; *GAPDH* antisense, 5´-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3´; *DSG1* sense, 5´-AAT GGC TAC ATT TGC AGG ACA-3´; *DSG1* antisense, 5´-ATC TCG GTC AGA GCC TCT TAC A-3´. PCR conditions for *GAPDH* comprised one cycle of 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 30 s and 72°C for 30 s, and a final elongation step of 72°C for 4 min. For PCR of *DSG1* cDNA, conditions were identical except for the time of initial denaturation step and the annealing temperature, which were 4 min and 58°C respectively. All PCR reactions were performed in a volume of 50 µl using an Eppendorf thermocycler, with 2.5 U Taq polymerase (Promega). Amplification products (15 µl) were separated and visualized by ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel electrophoresis.

Figure 2. Relative expression of *DSG1* mRNA in human thymus. Quantitative real-time PCR were performed using LightCycler thermocycler system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Amplification reactions were carried out using the FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche) according to the manufacturer's instructions in a total volume of 20 µl in glass capillaries, containing 2 µl of cDNA sample, 2 µl of FastStart DNA Master SYBR Green

I, 2 mM $MgCl_2$ and 10 pmol of each primer. PCR amplifications of GAPDH and DSG1 cDNAs were carried out simultaneously as previously described (20) and comprised one cycle of 94°C for 10 min, 40 cycles of 94°C for 20 s, 61°C for 10 s and 72°C for 12 s. At the end of amplification cycles, PCR products were subjected to melting temperature analysis in 3 steps: 10 s for 94°C (20°C/s), 30 s for 66°C (20°C/s) and slightly temperature increase of 0.1°C/s until 94°C to generate fusion curves. Data acquisition and analysis were carried out using LightCycler 3.5 software (A). For each cDNA amplification, the specificity of the PCR product was assessed by verifying that there was a single peak in melting curve analysis and by checking the size of the fragments by ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel electrophoresis. Data were normalized by dividing the *DSG1* crossing point (Cp) by the GAPDH Cp and are expressed as *DSG1* Cp / *GAPDH* Cp ratio x 100 (Relative expression of *DSG1* mRNA). Relative expression of *DSG1* mRNA in 9 human thymuses according to age of donors was analyzed using the Spearman's correlation test (B) and was compared between the 2 groups (individuals < 14 years old and > 14 years old) using Fisher corrected χ^2 test (C).

FOOTNOTES

[3]**Correspondence**: François TRON, INSERM U519, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 22, boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex 1, France

Tel: 33 2 32 88 80 71

Fax: 33 2 32 88 81 86

E-mail: francois.tron@chu-rouen.fr

[4]**Abbreviations**

Dsg 1 : desmoglein 1

DSG1 : desmoglein 1 gene

PF : pemphigus foliaceus

APC : antigen presenting cells

Cp : crossing point

DISCUSSION

DISCUSSION

Il est indéniable que l'autoAg joue un rôle déterminant dans l'initiation, la propagation et la pérennisation de la réponse auto-immune et *ipso facto*, dans le développement de MAI spécifiques et non spécifiques d'organe. De nombreux arguments sont venus confirmer le bien fondé de cette théorie notamment ceux issus des modèles expérimentaux de MAI développés chez l'animal. Dans ce cadre, la modification de l'autoAg par différents mécanismes tels que l'épissage alternatif de leurs transcrits constitue une hypothèse séduisante pour rendre compte du déclenchement d'un processus d'auto-immunité chez l'homme. Par ailleurs, considérant la rupture de tolérance large vis à vis de divers Ag du soi exprimés dans un tissu donné qui est observée au cours des MAI spécifiques et non spécifiques d'organe, on peut supposer que la réponse auto-immune initialement dirigée contre l'autoAg « initiateur » puisse s'étendre à d'autres spécificités antigéniques et ainsi participer à la propagation du processus auto-immun. Cette diversification de la réponse auto-immune pourrait notamment s'opérer par des mécanismes d'extension épitopique intermoléculaire. C'est dans cette optique qu' au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à étudier le rôle d'un autoAg clé des pemphigus, la Dsg1, et ceci à 2 niveaux de la réponse auto-immune : (i) à la phase d'initiation, avec l'étude de l'intervention de l'autoAg modifié par d'épissage alternatif dans la réponse lymphocytaire T chez les malades atteints de pemphigus ; (ii) à la phase de propagation, avec l'étude de la diversification de la réponse autoAc induite chez des souris normales immunisées avec un Ag unique.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous montrons pour la première fois l'existence d'une isoforme tronquée de la Dsg1 produite par un mécanisme d'épissage alternatif. Nous montrons qu'un épitope spécifique de cette Dsg1 tronquée se fixe aux molécules HLA de susceptibilité au PS et qu'il est capable d'induire la prolifération de PBMC isolées chez les malades atteints de PF et porteurs de ces mêmes allèles HLA en particulier, la molécule DRB1*0102.

Dans un premier temps, nous avons en effet mis en évidence l'existence d'un épissage alternatif des messagers du gène *DSG1*. Ces transcrits alternatifs sont exprimés dans l'épiderme d'individus normaux. Cet épissage est non canonique puisque les séquences flanquantes de l'intron 6 ne correspondent pas aux séquences consensus 5'-GT et AG-3'. Il est intéressant de constater que l'existence d'un épissage alternatif de messagers codant pour d'autres Ag du desmosome a été décrite pour les DP [Virata, 1992], la PG [Ozawa, 1995], la PL [Elliott, 1997] ainsi que pour une protéine desmosomale récemment identifiée, la kazrine [Groot, 2004]. Dans un contexte plus général, une récente étude *in silico* a estimé que les transcrits d'autoAg subissent un

épissage alternatif avec une fréquence plus élevée que celle de transcrits correspondant à des gènes sélectionnés au hasard (100% *vs* 42%). De plus, cette étude montre que le taux d'épissage non canonique des transcrits codant pour les autoAg est plus élevé que celui de gènes sélectionnés au hasard (80% *vs* 1%) [Ng, 2004]. Actuellement, une vingtaine d'autoAg ont été décrits dont les transcrits subissent un épissage alternatif avec ou sans la confirmation de la synthèse d'un variant protéique. Parmi eux, environ 20% sont caractérisés par l'insertion d'une séquence nucléique quelle soit d'origine exonique ou intronique comme c'est le cas pour les transcrits alternatifs de la Dsg1.

Bien qu'aucune caractérisation moléculaire précise n'ait été entreprise dans le but d'examiner l'origine de ce mécanisme dans le cas des transcrits de la Dsg1, l'intervention du polymorphisme du gène *DSG1* (SNP (809)) dans la genèse des transcrits alternatifs *DSG1* constitue une hypothèse séduisante. Dans près de 15% des cas, les mutations responsables de maladies génétiques interviennent dans l'épissage des ARNm. En effet, certaines mutations ponctuelles sont situées au niveau des sites régulateurs de l'épissage soit exoniques soit introniques [Cooper, 1997]. Un modèle très informatif de relation entre l'épissage alternatif et une MAI est fourni par l'association d'un polymorphisme du gène *CD45* avec la SEP. La présence d'un SNP silencieux (C77G) situé dans l'exon 4 du gène codant pour la molécule CD45, une tyrosine phosphatase impliquée dans l'activation lymphocytaire, est corrélée à une augmentation des transcrits contenant l'exon 4 du gène CD45. Par ailleurs, le SNP C77G est associé à la SEP [Jacobsen, 2000]. Lynch et Weiss ont montré que ce SNP module l'épissage de l'exon 4 en modifiant un site exonique régulateur de l'épissage qui inhibe normalement le site d'épissage en 5´ de cet exon [Lynch et Weiss, 2001]. Ainsi, le rôle d'un SNP dans la régulation de l'épissage est-il clairement mis en évidence dans ce modèle. Dans le cas du PF, le SNP (809) qui est localisé 50 pb en 3´ de la fin de l'intron 6 pourrait donc intervenir dans la régulation de l'épissage des transcrits de la Dsg1 *via* la modification d'un site exonique régulateur de l'épissage. Cette hypothèse est à rapprocher de celle formulée par Nakken *et al*, qui ont montré une association entre le génotype C/T d'un SNP situé sur l'intron 3 du gène de la protéine Ro52-kD et la présence d'Ac anti-Ro52-kD au cours du syndrome de Sjögren [Nakken, 2001]. L'hypothèse soulevée par les auteurs est que ce SNP joue un rôle dans l'épissage alternatif de l'exon 4 du gène *RO52*, à l'origine de l'isoforme Ro 52β, délétée du domaine leucine *zipper* et qui pourrait intervenir dans la rupture de la tolérance B vis à vis de la protéine Ro52-kD au cours du syndrome de Sjögren [Chan, 1995]. Par une approche de type transfection cellulaire de minigéne muté de l'insuline, une étude récente a mis pour la première fois en évidence la relation de 2 variants polymorphes localisés sur l'intron 1 du gène *INS* avec la génération de transcrits alternatifs. L'allèle A du SNP IVS1-6A/T, localisé sur le site d'épissage 3' de l'intron 1, est associé à une production

augmentée de transcrits matures comportant l'intron 1. Ces transcrits alternatifs induisent une sécrétion d'insuline plus élevée que les transcrits *INS* normaux. De plus, le rare polymorphisme IVS1+5insTTGC qui consiste en une insertion localisée à proximité du site d'épissage 5' de l'intron 1 conduit à l'activation d'un site cryptique d'épissage et à la production de transcrits alternatifs caractérisés par une insertion de 30 pb en 3' de l'exon 1 [Kralovicova, 2006]. Ces résulats indiquent que les polymorphismes IVS1-6A/T et IVS1+5insTTGC sont des variants du gène *INS* qui affectent l'épissage des ARNm de l'insuline et que le SNP IVS1-6A/T présent sur le locus *IDDM2* de susceptibilité au diabète de type 1 est un polymorphisme fonctionnel. Toutefois, dans notre modèle l'étude préliminaire de l'expression des transcrits normaux et alternatifs de la Dsg1 en fonction du génotype du SNP (809) n'a pas permis de corréler l'un des génotypes à une augmentation ou une diminution d'un ou des 2 types de transcrits *DSG1*. De même, aucune association n'a pu être établie entre un génotype particulier et l'expression relative des transcrits alternatifs *DSG1*. Cependant, ces observations ont été faites sur un faible effectif (n=9). Elles seront donc poursuivies sur un plus grand nombre de sujets sains permettant une analyse statistique plus puissante.

Dans un second temps, nous avons confirmé l'expression de la Dsg1 tronquée dans l'épiderme humain normal. En effet, les 2 Ac polyclonaux dirigés contre cette isoforme de la Dsg1 et qui réagissent avec la forme recombinante de cette protéine reconnaissent en immunoempreinte une protéine de 25 kDa exprimée dans l'épiderme et les kératinocytes humains. De plus, ils reconnaissent, dans une analyse en immunoempreinte d'une carte protéique 2D d'épiderme humain, une protéine unique caractérisée par des coordonnées de poids moléculaire et de p*I* (25 kDa, p*I* 4,7) très proches de celles attendues pour l'isoforme tronquée de la Dsg1 (22, 4 kDa, p*I* 5,5). Cette Dsg1 de 25 kDa n'est pas exprimée dans d'autres tissus épithéliaux tels que l'intestin grêle ou les reins. Ces résultats indiquent que l'expression de cette isoforme est restreinte à l'épiderme et qu'elle est vraisemblablement synthétisée par les kératinocytes. Plus particulièrement, les analyses en IFI montre que les Ac anti-INT6 donnent un marquage fluorescent des kératinocytes des couches basales de l'épiderme humain. Nos résultats démontrent qu'une isoforme tronquée de la Dsg1, générée par un mécanisme d'épissage alternatif, est physiologiquement exprimée dans l'épiderme humain de sujets sains, très certainement par les kératinocytes des couches basales. Ces travaux fournissent par ailleurs une autre démonstration *ex vivo* qu'un autoAg majeur de la réponse auto-immune au cours de MAI spécifiques d'organe, possède un (des) variant(s) alternatif(s).

Cette isoforme de la Dsg1 pourrait avoir différents rôles. D'un point de vue physiologique, cette isoforme tronquée ayant perdu la majeure partie de la région EC ainsi que les domaines transmembranaire et intracellulaires de la Dsg1 devrait être

soluble et probablement incapable d'exercer la fonction d'adhésion. La perte de la propriété adhésive de la Dsg1 pourrait par conséquent aboutir à une fragilisation du desmosome. En effet, une étude *in vitro* a montré que l'expression forcée d'une forme mutante de la Dsg1, amputée d'une partie de sa région EC, dans des cellules épithéliales en culture compromet l'adhésion desmosomale [Serpente, 2000]. Une même observation a été faite avec l'expression d'une forme tronquée de la Dsg3 [Hanakawa, 2000]. La quantification par PCR quantitative en temps réel des transcrits alternatifs de la Dsg1 dans l'épiderme de sujets sains a montré qu'ils représentent de 6 à 30% des transcrits totaux *DSG1.* Ces résultats suggèrent qu'il existe une variabilité interindividuelle de l'expression de la Dsg1 tronquée. Une hypothèse est que chez les patients atteints de pemphigus, une expression élevée de cette isoforme de la Dsg1 pourrait rendre plus permissive l'action acantholytique des autoAc anti-Dsg1 pathogènes. Il serait par conséquent intéressant de quantifier les transcrits alternatifs *DSG1* à partir de biopsies prélevées chez des malades atteints de PF ou d'autres variétés de pemphigus caractérisées par une réponse autoAc anti-Dsg1. En effet, une modification de l'expression des transcrits *DSG1* pourrait constituer un facteur de susceptibilité à ces maladies.

D'un point de vu immunologique, il est désormais bien établi que les isoformes d'autoAg générées par épissage alternatif peuvent jouer un rôle dans l'initiation et la maintenance des réponses auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organe, à travers différents mécanismes que nous avons présentés dans l'introduction de ce mémoire. Un premier mécanisme consiste en la génération d'isoformes d'autoAg contenant des néo-épitopes susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T autoréactifs et/ou des autoAc présents chez les malades atteints de MAI. Les analyses *in silico* montrent en effet que des séquences spécifiques d'isoformes d'autoAg, générées par épissage alternatif, peuvent constituer des épitopes cibles des autoAc et/ou de la réponse lymphocytaire T restreinte par des molécules HLA de classe I et II [Ng, 2004]. Le modèle le plus éloquent est celui établi par Voskuhl *et al* dans la SEP au cours de laquelle une réponse lymphocytaire T restreinte aux molécules HLA DR2/DQw1 est spécifiquement dirigée contre un peptide, X2MBP, porté par 2 isoformes de la MBP et absente de l'isoforme majoritaire de cet autoAg [Voskuhl, 1993a ; Voskuhl, 1993b ; Voskuhl, 1994]. Ces travaux nous ont amené à examiner le rôle potentiel de l'isoforme tronquée de la Dsg1 dans la réponse auto-immune T au cours des pemphigus. Tout d'abord, afin de tester la possibilité qu'une séquence spécifique de cette isoforme puisse se fixer certaines molécules HLA de classe II de susceptibilité à la maladie, nous avons évalué l'affinité relative de 4 peptides chevauchants le domaine EC2 et le peptide INT6 pour les molécules DRB1*0101, *0102, *0401 et *0402. L'un de ces peptides,

EC2/INT6 216-235, se fixe avec une forte affinité à 3 de ces molécules HLA de classe II et de manière intéressante, avec une haute affinité à la molécule DRB1*0102. Etant donné que l'allèle DRB1*0102 constitue un facteur de prédisposition au PS [Moraes, 1991 ; Miyagawa, 1999b ; Pavoni, 2003] notamment, dans la population française [Loiseau, 2000 ; Martel, 2000], nous avons étudié la réponse lymphocytaire T vis à vis du peptide EC2/INT6 216-235 chez les patients atteints de PF et de PV. Le peptide sélectionné induit la prolifération des PBMC chez 4 malades atteints de PF (50%). Trois d'entre eux portent les allèles HLA de classe II (DRB1*0102 et *0101) qui accommodent avec une bonne affinité le peptide EC2/INT6 216-235. Bien que le sous-type de la molécule DR14 exprimée par le quatrième malade dont les PBMC prolifèrent vis à vis de ce peptide n'ait pas été déterminé, il est intéressant de rappeler que plusieurs molécules DR14 de susceptibilité au PS notamment, DRB1*1401 et *1406, partagent des résidus aminoacides aux positions critiques de la poche d'ancrage peptidique avec les molécules DRB1*0102 et *0101 [Pavoni, 2003]. Bien qu'un des malades de PF exprime la molécule DRB1*0101, ses cellules T ne prolifèrent pas lorsqu'ils sont stimulés avec le peptide EC2/INT6 216-235 ceci, malgré un taux sérique d'Ac anti-Dsg1 très élevé (202 U/ml). Par conséquent, la prolifération lymphocytaire T ne requiert pas seulement la présentation du peptide par les CPA mais sans doute aussi un nombre suffisant de cellules T spécifiques et fonctionnelles. D'une part et en accord avec leur génotype HLA de classe II et leur répertoire T, les malades atteints de PF n'ont donc probablement pas tous la capacité de monter une réponse auto-immune T dirigée contre l'épitope porté par l'isoforme tronquée de la Dsg1. D'autre part, le statut clinique (rémission *vs* phase active) et le traitement des patients modulent très certainement la capacité proliférative des lymphocytes T. De manière intéressante, la fréquence des malades atteints de PV dont les PBMC prolifèrent en réponse au peptide d'intérêt est plus faible que celle observée chez les malades atteints de PF (7% *vs* 50%). Par ailleurs, aucune prolifération des PBMC isolées chez les patients atteints de pemphigoïde bulleuse n'est induite par le peptide EC2/INT6 216-235.

L'ensemble de ces résultats permet de formuler une hypothèse attractive sur le rôle de l'isoforme tronquée de la Dsg1 dans la physiopathologie du PF, selon la cascade d'événements suivante : l'isoforme soluble de la Dsg1 pourrait circuler dans les organes lymphoïdes secondaires (désequestration anatomique), être apprêtée par des CPA exprimant notamment la molécule HLA de classe II DRB1*0102 et présentée aux cellules T spécifiques de ce complexe. Une fois activés, ces lymphocytes T pourraient activer des cellules B spécifiques et finalement aboutir à la production d'Ac anti-peptide de la Dsg1 tronquée. Enfin, une diversification de la réponse autoAc contre des épitopes de la Dsg1 présents sur les domaines EC1 et EC2 pourrait survenir *via* un phénomène d'extension épitopique intramoléculaire. Concernant cette dernière proposition, il est essentiel de

mentionner qu'au cours de l'EAE, une réponse lymphocytaire T initialement dirigée contre des épitopes spécifiques de variants alternatifs, peut se diversifier par des phénomènes d'extension épitopique intra- et intermoléculaire. En effet, le transfert de clones T spécifiques du peptide X2MBP à des souris SJL/J déclenche une réponse lymphocytaire T anti-X2MBP lors de la première phase de l'EAE, qui s'étend à des réponses lymphocytaires T dirigées contre des épitopes immunodominants de l'isoforme majeure de la MBP et de la PLP lors de la seconde phase de la maladie [Zhao, 1995].

Il serait intéressant de corroborer expérimentalement certaines de ces hypothèses. Tout d'abord, afin de confirmer la circulation de l'isoforme tronquée de la Dsg1, sa présence dans le sérum humain pourrait être recherchée à la fois chez des individus sains et chez les malades de pemphigus. A cet égard, Lanza *et al* ont récemment mis en évidence l'existence dans le sérum humain d'une isoforme tronquée de la Dsg3 d'environ 30 kDa [Lanza, 2006]. Ces auteurs ont détecté cette Dsg3 tronquée dans le sérum de malades atteints de PV, de pemphigoïde bulleuse et d'individus sains par immunoprécipitation à l'aide d'un Acm dirigé contre le peptide 49-60 du domaine EC1 de la Dsg3. Cette Dsg3 soluble serait composée des domaines EC1 et EC2 de la forme canonique de la Dsg3. Bien qu'aucune caractérisation du mécanisme à l'origine de la production de cette Dsg3 tronquée et d'étude de son d'implication dans la réponse auto-immune au cours des pemphigus n'ait été entreprise, cette observation s'avère malgré tout très intéressante au regard des similitudes que l'on peut relever avec nos résultats de l'étude de l'isoforme tronquée de la Dsg1.

En second lieu, l'analyse de la réactivité autoAc dirigée contre l'isoforme tronquée de la Dsg1 pourrait être réalisée chez les malades atteints de pemphigus et chez des sujets normaux par ELISA en utilisant comme Ag le peptide EC2/INT6 216-235. Un modèle similaire a été décrit par Tanaka *et al* qui ont montré l'existence d'une forme tronquée de la sous unité β (gp130) du récepteur à l'IL6 produite par un mécanisme d'épissage alternatif et caractérisée par l'addition à son extrémité C-terminale d'un pentapeptide spécifique de cette isoforme (NIASF) [Tanaka, 2000]. Cette isoforme soluble et plus particulièrement la séquence C-terminale de 15 aminoacides générée par la réunion entre un peptide de la gp130 et le peptide NIASF est reconnue par les autoAc présents chez 75% des malades atteints de PR. Au commencement de nos travaux, les résultats sur cette isoforme de la gp130 nous avaient tout d'abord suggéré d'analyser la production d'IgG dirigées contre le peptide INT6 dans le sérum des patients atteints de PF. Cependant, l'étude en ELISA avec ce peptide n'a pas permis de mettre en évidence d'IgG anti-INT6 dans le sérum des malades testés (n=34). Malgré cela et à la lumière des données obtenues sur la prolifération lymphocytaire T vis à vis du peptide EC2/INT6 216-235, il serait désormais intéressant de vérifier la production d'IgG anti-EC2/INT6 216-

235 chez les malades, en particulier chez ceux dont les PBMC prolifèrent en présence de ce peptide et/ou qui expriment les molécules HLA de classe II capables de fixer ce peptide.

Enfin dans une perspective à plus long terme, il est possible d'envisager la production de clones lymphocytaires T spécifiques du peptide EC2/INT6 216-235 à partir des PBMC qui prolifèrent en réponse à cet Ag et ainsi d'étudier leurs caractéristiques phénotypiques et leurs propriétés fonctionnelles afin de mieux comprendre leur rôle dans la physiopathologie de la maladie.

Un autre mécanisme est que l'expression thymique exclusive d'une isoforme d'autoAg ne présentant pas certains épitopes portés par la forme canonique de l'autoAg (uniquement exprimée à la périphérie), peut conduire à l'émergence de clones T autoréactifs capables de réagir à la périphérie avec ces mêmes déterminants antigéniques. Cette hypothèse est illustrée par un modèle murin d'EAE dans lequel l'expression thymique restreinte à l'isoforme tronquée DM20 est corrélée à la présence de cellules T autoréactives spécifiques de la forme complète de la PLP, exprimée dans le système nerveux central mais exclue du thymus [Klein, 2000]. De même, un transcrit alternatif de l'autoAg ICA512/IA-2, délété d'une séquence codant pour plusieurs épitopes T et exclusivement exprimée dans le thymus, a été décrit et pourrait participer à la rupture de la tolérance contre ICA512/IA-2 au cours du diabète de type 1 [Diez, 2001]. Nous avons transposé cette observation à notre modèle et commencé à étudier l'expression thymique des transcrits normaux et alternatifs de la Dsg1 dans le thymus humain. Nos résultats sur l'expression thymique des transcrits normaux de la Dsg1, présentés sous la forme d'un article en préparation, sont discutés plus bas. L'analyse de l'expression thymique des transcrits alternatifs *DSG1* est en cours mais les résultats préliminaires indiquent que tout comme les messagers *DSG1,* les transcrits codant pour l'isoforme tronquée de la Dsg1 sont exprimés dans le thymus humain. Cependant, ces observations ont été faites sur un faible effectif (n=10) et demandent à être confortées chez un plus grand nombre de thymus.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous avons caractérisé par une analyse protéomique ciblée, la réponse Ac anti-desmosome induite chez des souris normales immunisées avec la région EC recombinante de la Dsg1 (rEC1/5-Dsg1). Afin de contrôler la production d'IgG anti-Dsg1 dans le sérum des souris BALB/c et CD1 immunisées, nous avons mis au point un ELISA utilisant comme Ag la baculoprotéine rEC1/5-Dsg1 purifiée. Les analyses par ELISA-rEC1/5-Dsg1 montrent que la totalité des souris immunisées (n=20) produisent dans leur sérum des IgG réagissant avec la région EC de la Dsg1. De plus, les sérums de ces animaux reconnaissent en immunoempreinte,

la protéine rEC1/5-Dsg1 et la Dsg1 présente dans un extrait protéique d'épiderme humain. Trois Acm, 1N5, 1D8 et 8C3, ont été dérivés des souris ayant développé une réponse Ac anti-Dsg1 et sélectionnés sur leur capacité à réagir avec la protéine rEC1/5-Dsg1 en ELISA. L'analyse en IFI sur coupe de peau humaine montre qu'ils se fixent aux kératinocytes de l'épiderme avec un marquage fluorescent (de la SIC) identique à celui obtenu avec un sérum de PF contenant des Ac anti-Dsg1. Les Acm 1N5 et 1D8 reconnaissent en immunoempreinte, la protéine rEC1/5-Dsg1 et la Dsg1 présente dans un extrait protéique d'épiderme humain tandis que le 8C3 ne réagit pas avec la Dsg1 et sa région EC recombinante dans les conditions dénaturantes du SDS-PAGE. Cette observation suggère que ce dernier est dirigé contre un épitope conformationnel de la Dsg1 puisque même avec une plus forte concentration en IgG dans le surnageant de l'hybridome, la fixation du 8C3 à la Dsg1 n'est pas révélée en immunoempreinte. Par ailleurs, nos résultats non publiés montrent que le 1N5 et le 1D8 réagissent avec des épitopes localisés respectivement sur les domaines EC4-EC5 et EC1-EC2 de la Dsg1. Ainsi, les propriétés immunologiques de ces 3 Acm reflètent celles des autoAc anti-Dsg1 produits chez les patients atteints de PF, qui ciblent divers épitopes des domaines EC de la Dsg1 [Sekiguchi, 2001] à la fois conformationnels et non conformationnels [Kowalczyk, 1995 ; Hacker, 2002].

De façon tout à fait surprenante, 2 souris immunisées avec la région EC de la Dsg1 réagissent en immunoempreinte sur un extrait d'épiderme humain avec la Dsg1 et avec d'autres Ag de plus haut poids moléculaire. Plus précisément, le sérum d'une des souris révèle une bande de 190 kDa et le sérum de la seconde un doublet protéique de 190-210 kDa. Nous avons dérivé des hybridomes à partir des splénocytes isolés de ces 2 souris puis sélectionné et cloné 2 d'entre eux, CK1 et 10A1, sur la capacité des Acm sécrétés à donner en IFI un marquage fluorescent « en résille » (de la SIC) sur des coupes de peau humaine et dans un second temps, un profil d'immunoempreinte sur un extrait d'épiderme humain identique à celui observé avec les sérums des souris correspondantes. En IFI, CK1 donne à la fois un marquage fluorescent « en résille » de l'épiderme et de la membrane basale de la jonction dermo-épidermique sur des coupes de peau humaine et d'œsophage de souris. CK1 reconnaît en immunoempreinte un doublet de protéines épidermiques de 190 et 210 kDa, identique à celui reconnu par le sérum parental. 10A1 donne un marquage fluorescent de la SIC en IFI sur des coupes de peau humaine et d'œsophage de souris et reconnaît en immunoempreinte une protéine épidermique de 190 kDa. Les analyses en immunoempreinte à fluorescence infrarouge montrent que le doublet de 190-210 kDa et l'Ag de 190 kDa reconnus respectivement par le CK1 et le 10A1 sont aussi reconnus par les IgG présentes dans un sérum d'un malade atteint de PPN. Grâce à l'immunoempreinte à fluorescence infrarouge, nous avons mis en évidence

que les protéines ciblées par les Acm CK1 et 10A1 sont reconnues par les autoAc produits au cours du PPN. La méthodologie mise au point utilisant cette technologie nous donc a permis de comparer les spécificités des Ac observés chez les souris immunisés avec la Dsg1 et chez les malades atteints de PPN.

La plupart des MAI sont caractérisées par une réponse auto-immune dirigée contre plusieurs Ag de l'organe cible dont l'identification est cruciale pour une meilleure compréhension des processus physiopathologiques qui concourent à leur développement et/ou à celui de leurs modèles expérimentaux. Ainsi, des technologies qui permettent une caractérisation globale des spécificités de la réponse auto-immune telle que la réponse autoAc sont requises. L'analyse protéomique ciblée qui est fondée sur la triade « électrophorèse bidimensionnelle/immunoempreinte/spectrométrie MALDI-ToF », constitue une approche puissante qui offre la possibilité de caractériser la diversité de la réponse autoAc au cours des MAI. La faisabilité de cette stratégie a été démontrée à la fois dans les MAI humaines [Stulik, 2003 ; Almeras, 2004] et expérimentales [Thébault, 2002]. A cet égard, nous avons précédemment démontré que l'analyse protéomique ciblée est un outil efficace pour identifier les protéines ciblées par la réponse autoAc produite au cours d'un modèle murin spontané de LED. En effet, nous avons défini chronologiquement la spécificité des Ac présents dans le sérum des souris (NZW x BXSB)F1 ou WB à différents âges de la vie et selon le sexe grâce à une approche d'analyse protéomique ciblée. De la sorte, l'immunocriblage de carte protéique 2D de cellules HL60 avec les sérums des animaux nous a notamment permis de montrer que la réponse auto-immune B observée chez les mâles WB se développe séquentiellement contre 6 protéines : la vimentine, dans un premier temps, les protéines RAD23B, Hsp60 puis α-énolase et hnRNP L et enfin, la nucléosphosmine [Thebault, 2002]. Afin d'identifier les protéines cibles des Acm CK1 et 10A1, nous avons donc choisi comme stratégie, l'immunocriblage de carte protéique 2D d'épiderme humain couplé à la spectrométrie de masse MALDI-ToF. En premier lieu, nous avons réalisé une carte protéique 2D d'épiderme humain en utilisant une insertion passive des protéines contenues dans l'extrait durant l'étape de réhydratation du gel de première dimension (gel GPI, cf. matériels & méthodes). Cette approche nous a permis de visualiser sur la carte protéique 2D colorée au bleu de Coomassie, la protéine de 190 kDa reconnue par les Acm 10A1 et CK1. Cependant, l'utilisation de cette méthode « classique » n'est pas adaptée à la séparation des protéines de haut poids moléculaire dont l'entrée dans le gel GPI est limitée. L'utilisation de cette méthode ne nous a pas permis d'identifier formellement la protéine de 190 kDa du fait de sa trop faible quantité dans le gel 2D et de visualiser la protéine de 210 kDa dans le gel 2D coloré au bleu de Coomassie. En conséquence, pour augmenter l'entrée des protéines de haut poids moléculaire dans le gel de première dimension, les protéines ont été

insérées activement dans le gel grâce à l'action du courant durant l'étape d'IEF, en chargeant l'extrait à l'extrémité basique (ou acide) du gel GPI. Cette seconde méthode facilite l'entrée des protéines de haut poids moléculaire dans le gel de première dimension et par la même, la densité des taches protéiques présentes dans la carte protéique 2D d'épiderme humain. Cette approche méthodologique a de ce fait permis aux protéines de 190 et 210 kDa de pénétrer dans le gel 2D en quantité suffisante pour être visualisées, excisées et identifiées par spectrométrie de masse après immunocriblage de cette nouvelle carte 2D avec les Acm 10A1 et CK1. Ainsi, avons nous démontré que l'Ag cible de l'Acm 10A1 est l'envoplakine, et que le CK1 reconnaît à la fois l'envoplakine (ENV) et la périplakine (PPL). Plus précisément, l'immunocriblage d'une banque d'expression d'ADNc de kératinocytes humains (λgt11) avec le CK1 montre que celui-ci réagit avec une séquence peptidique comprise dans le sous-domaine *linker* de l'ENV.

Ces Acm possèdent des propriétés intéressantes. Premièrement, l'analyse protéomique des spécificités du 10A1 et du CK1 montre que tous 2 reconnaissent la PPL mais que ceux-ci réagissent avec des épitopes différents de cette plakine étant donné que le CK1 reconnaît aussi l'ENV. La démonstration par le criblage de la banque d'expression λgt11, que le CK1 est dirigé contre un épitope du sous-domaine *linker* de l'ENV peut expliquer sa réactivité contre le doublet de 190-210 kDa. En effet, une réactivité croisée du CK1 vis-à-vis de ces 2 molécules est envisageable puisque la structure primaire du sous-domaine *linker* de l'ENV partage une identité de 48% avec celle de la PER. De plus, celui-ci partage une identité de 42% avec le sous-domaine *linker* de la plectine (PL) qui est le seul membre de la famille des plakines à être exprimé dans les plaques desmosomales et hémidesmosomales de l'épiderme. Ces dernières étant localisées au niveau de la jonction dermoépidermique, une réactivité croisée du CK1 contre la PL pourrait rendre compte du marquage fluorescent de la membrane basale de la peau humaine et de l'œsophage de souris obtenu en IFI avec cet Acm. On peut donc supposer que cette « polyréactivité » du CK1, dirigé à la fois contre l'ENV, la PER et probablement contre la PL, soit la conséquence de la forte homologie qui existe entre les sous-domaines *linker* de ces 3 molécules. De façon intéressante, le *linker* de l'ENV qui est une des cibles des autoAc présents chez les malades de PPN [Nagata, 2001], représente un épitope majeur de la réponse autoAc dirigée contre le doublet ENV-PER au cours de la maladie. Effectivement, 92% des sérums de PPN ayant une réactivité anti-190-210 kDa reconnaissent le *linker* de l'ENV et de la PPL. De plus, le peptide LLDRKSGKQYSIEAALRCRR contenu dans cette région de l'ENV représente un épitope immunodominant reconnu par 75% des sérums de malades [Zhang, 2006]. Nous avons synthétisé sous forme recombinante le produit du clone de la banque λgt11 qui comprend la majorité du *linker* de l'ENV (RecENV-L) et montré que 48.5% des sérums de PPN (n=33)

et 62% des sérums de malades contenant des autoAc anti-190-210 kDa (n=21) reconnaissent ce fragment protéique de l'ENV humaine en immunoempreinte. Bien que ce dernier résultat diverge de celui obtenu par Zhang *et al* (62% *vs* 92%), il donne une prévalence proche de celle établie dans l'étude princeps (comprise entre 58 et 69%) [Nagata, 2001]. Afin de réaliser une étude de prévalence à plus large échelle, nous avons mis au point un test de détection des Ac anti-RecENV-L en utilisant la technologie Bio-Plex (Biorad) et étudions actuellement la présence d'IgG spécifiques dans le sérum des patients atteints de PPN, de PV et PF.

A la lumière de ces résultats, on peut considérer que le sous-domaine *linker* de l'ENV, cible du CK1, représente un épitope immunodominant de la réponse anti-plakines observée au cours du PPN. Etant donné qu'aucune preuve de la pathogénicité des Ac anti-ENV-PER n'a été fournie à ce jour, il serait très intéressant d'étudier le potentiel pathogène de l'Acm CK1. Les premiers résultats obtenus par transfert passif à des souriceaux nouveau-nés BALB/c indiquent que le CK1 a la capacité de se fixer *in situ* dans l'épiderme des souris receveuses sans la formation de bulles. Il est important de continuer ces investigations afin de confirmer ou d'infirmer le caractère pathogène d'un Acm qui cible un épitope majeur des autoAg les plus spécifiques de la réponse auto-immune du PPN. Il faut ici rappeler que le transfert passif d'IgG anti-DPI et anti-DPII, purifiées à partir des sérums de malades atteints d'érythème multiforme, à des souriceaux nouveau-nés induit une acantholyse associée à un détachement des filaments intermédiaires de la plaque desmosomale dans l'épiderme des souris receveuses [Foedinger, 1998].

Deuxièmement, les Acm 10A1 et CK1 ne se fixent pas uniquement à l'épiderme humain mais aussi à l'épithélium de souris indiquant qu'ils réagissent contre des épitopes B partagés par les molécules desmosomales de l'homme et de la souris. La séquence aminoacide du *linker* de l'ENV humaine et de souris est hautement conservée entre ces 2 espèces (88% d'identité) et la PER humaine partage une identité de 76% avec son homologue murin. Une réactivité croisée pourrait rendre compte de la réactivités de ces 2 Acm vis à vis des épithéliums humain et de souris.

L'observation majeure de cette étude est que l'immunisation de souris normales avec un autoAg unique, la Dsg1, peut induire une réponse Ac contre cet Ag mais aussi contre d'autres protéines desmosomales de la famille des plakines, mimant la diversité et le chevauchement des spécificités des autoAc détectés au cours des pemphigus. Cette observation étonnante permet de soulever quelques hypothèses afin d'expliquer la nature du (des) phénomène(s) impliqué(s) dans cette diversification de la réponse immune B. Premièrement, les Ac anti-Dsg1 pourraient se fixer à d'autres Ag desmosomiaux. Cependant, la Dsg1 n'a aucune homologie de séquence avec l'ENV ou la PER et nos

résultats montrent par ailleurs que les Acm 10A1 et CK1 ne réagissent pas avec la Dsg1 en ELISA ni en immunoempreinte sur un extrait d'épiderme humain. Par conséquent, bien que la réactivité croisée entre Ag du soi peut rendre compte de la diversification de la réponse auto-immune B au cours de certaines MAI [Elkon, 1986], nos données n'étayent pas cette hypothèse. Une seconde hypothèse est que la production d'Ac anti-PER et anti-ENV résulte d'un mécanisme d'extension épitopique. Il est défini comme la diversification des réponses immunes à travers le temps et est caractérisé par une expansion progressive du spectre des spécificités lymphocytaires T et B [Vanderlugt, 1996 ; James, 1998a ; Vanderlugt, 2000]. L'extension épitopique est un phénomène fréquemment rencontré dans les MAI spécifiques d'organe dans lesquelles de multiples Ag de l'organe cible sont généralement reconnus par les effecteurs de la réponse auto-immune. Ce mécanisme implique que la réponse auto-immune puisse s'étendre non seulement à différents épitopes d'une même molécule (extension intramoléculaire) mais aussi à des épitopes portés soit par des molécules physiquement associées, soit par des molécules cryptiques relarguées dans un contexte inflammatoire (extension intermoléculaire) [Vanderlugt, 1996 ; James, 1998a ; Vanderlugt, 2000]. La démonstration qu'une extension épitopique intramoléculaire se produit au cours des pemphigus a été récemment fournie par l'analyse de la réponse anti-Dsg1 dans le *fogo selvagem* [Li, 2003] et anti-Dsg3 dans le PV [Salato, 2005]. A côté de ce phénomène d'extension épitopique désormais bien établi, plusieurs observations suggèrent que la diversification de la réponse auto-immune B au cours des pemphigus est le fruit d'un mécanisme d'extension intermoléculaire : (i) le passage d'une forme clinique et histologique de PV à une forme de PF associée à un changement de la spécificité des autoAc (transition anti-Dsg3 à anti-Dsg1) et inversement [Kawana, 1994 ; Ishii, 2000 ; Komaï, 2001] ; (ii) le passage de la forme muqueuse de PV avec une production exclusive d'Ac anti-Dsg3 à la forme cutanéomuqueuse de la maladie caractérisée par une nouvelle réactivité autoAc dirigée contre la Dsg1 [Ding, 1997 ; Miyagawa, 1999a ; Salato, 2005] ; (iii) l'observation d'une extension de la réponse auto-immune B chez un malade de PPN, initialement dirigée contre la DPI et l'Ag de 170 kDa et se diversifiant vers les autres autoAg de la famille des plakines (DPII, BPAG1, PER et ENV) [Bowen, 2000]. Enfin, dans le cas du pemphigus, il faut rappeler que les 3 molécules considérées dans notre étude, la Dsg1, la PER et l'ENV, font partie du complexe desmosomal et qu'elles peuvent être la cible de la réponse auto-immune des patients atteints de pemphigus. En effet, les autoAc anti-Dsg1 sont présents dans le sérum des malades de PPN dans 65% cas [Amagai, 1998], et plusieurs études ont démontré l'existence d'IgG dirigées contre l'ENV et la PER dans le sérum des patients atteints de PV et de PS [Kazerounian, 2000 ; Nagata, 2001 ; Abreu-Velez, 2003a].

Toutefois, la réalité du phénomène d'extension épitopique intermoléculaire au cours des pemphigus n'a pas encore été confirmée.

Notre observation que l'immunisation de souris normales avec la région EC de la Dsg1 peut induire une réponse Ac contre des autoAg de la famille des plakines, e.g. envoplakine et périplakine, procure le premier argument fort supportant le concept d'extension épitopique intermoléculaire et pourrait ainsi expliquer la large rupture de la tolérance B vis à vis des Ag épidermiques observée au cours du PPN. Puisque toutes les protéines de la famille des plakines sont cytoplasmiques, elles sont probablement inaccessibles au système immunitaire dans une cellule intacte. C'est pourquoi, il a été postulé que : (i) les malades produisent initialement des autoAc dirigés contre les protéines transmembranaires, Dsg1 et Dsg3, capables de provoquer la libération de molécules associées aux Dsg ou d'Ag cryptiques. (ii) ces autoAg sont ensuite capturés, apprêtés et présentés par des CPA aux cellules T spécifiques qui une fois activées, activent à leur tour des cellules B spécifiques des plakines et *in fine* déclenchent la synthèse d'autoAc anti-plakine [Hashimoto, 2003]. Une hypothèse séduisante qui pourrait expliquer cette « désequestration » antigénique des plakines médiée par les autoAc anti-Dsg est l'implication du processus d'apoptose kératinocytaire. En effet, il est désormais bien établi que les Ac anti-Dsg présents chez les malades de pemphigus sont capables d'induire une apoptose des kératinocytes et que ce mécanisme intervient très certainement dans le processus acantholytique qui caractérise la maladie [Puviani, 2003; Wang, 2004b; Pelacho, 2004]. Or, au cours de l'apoptose kératinocytaire, les caspases clivent la majorité des protéines desmosomales les Dsg1 et Dsg3, la PG, la PKP-1, les DP, la PL et la PER [Weiske, 2001 ; Aho, 2004 ; Dusek, 2006]. De la sorte, l'apoptose des kératinocytes pourrait intervenir, *via* l'action des caspases, dans le(s) processus lésionnel(s) en provoquant la dissociation des jonctions desmosomales et le relargage des Ag desmosomiaux qui seraient alors susceptibles de rompre la tolérance au soi. En accord avec cette hypothèse, on conçoit que les autoAc anti-Dsg1 pourraient conduire à la production d'Ac anti-plakine en donnant lieu à la libération de ces Ag intracellulaires et de ce fait, à leur transport de l'épiderme aux ganglions lymphatiques [Hemmi, 2001] et à leur rencontre avec les cellules T spécifiques des plakines. Notre étude montrant que l'immunisation avec la Dsg1 peut initier la production d'Ac anti-PER et anti-PPL conforte ce modèle d'extension épitopique. La démonstration par IFI que les IgG anti-Dsg1, anti-ENV et anti-PER produites chez les animaux immunisés se fixent aux Ag épidermiques de souris est en accord avec cette cascade d'événements potentiels, à savoir l'activation de lymphocytes B de souris spécifiques de la Dsg1 puis de l'ENV et de la PER.

Ce modèle est évocateur des réponses auto-immunes systémiques induites expérimentalement chez les animaux immunisés avec certains autoAg associés au LED.

En effet, différents modèles d'extension épitopique intermoléculaire de la réponse B ont été développés impliquant plus particulièrement, les complexes du splicéosome et du nucléosome qui comprennent tous 2 des Ag ciblés par la réponse autoAc au cours de la maladie lupique. Plus précisément, les souris immunisées avec l'un de ces autoAg recombinants, Ro60-kD, Ro52-kD ou La, produisent des Ac qui réagissent avec chacune des autres molécules du complexe La/Ro RNP [Tseng, 1997]. Par ailleurs, une extension de la réponse Ac contre les Ag Ro/La vers les molécules chaperonnes, calréticuline et Grp78 (*glucose-regulated protein 78*), a été observée chez les souris immunisées avec la protéine Ro52-kD et/ou Ro60-kD [Kinoshita, 1999]. De même, les souris immunisées avec des peptides de l'autoAg Sm B/B' développent une réponse auto-immune anti-splicéosome notamment, la production d'autoAc dirigés contre d'autres ribonucléoprotéines et contre l'ADN [James, 1998b]. Enfin, les souris lupiques (SWR x NZW)F1 immunisées avec des peptides antigéniques dérivés des histones H2B et H4 produisent de forts titres d'Ac anti-ADN double brin et anti-nucléosome [Madaio, 2000].

Enfin, la potentialité de l'induction d'une réponse Ac dirigée contre l'ENV et la PER chez les souris normales immunisées avec la Dsg1 plaide en faveur de l'hypothèse auto-immune de production des autoAc anti-plakines chez les malades atteints de PPN et conteste par la même la position stricte affirmant que la production de ces populations d'Ac est uniquement dépendante de la prolifération tumorale qui caractérise les patients atteints de cette variété de pemphigus.

La phase finale de ce travail de thèse a eu pour but d'étudier l'expression de la Dsg1 dans le thymus humain normal. Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux ont en effet mis en évidence l'expression thymique d'ARNm codant pour des protéines spécifiques de tissus dont plusieurs correspondent à des cibles de certaines MAI comme par exemple, le diabète de type 1, la SEP ou la thyroïdite autoimmune [Derbinsky, 2001; Sospedra, 1998]. Toutefois, aucune étude n'a fait état de l'expression thymique de la Dsg1. En nous basant sur ces données, nous avons tout d'abord entrepris d'étudier l'expression de la Dsg1 dans le thymus humain au niveau transcriptionnel. Les analyses par PCR montrent que les transcrits normaux *DSG1* sont présents dans 90,6% des thymus des individus sains testés (n=32). Ces résulats évoquent l'expression thymique d'autres autoAg ciblés par la réponse auto-immune B au cours de certaines MAI tels que le récepteur à l'ACh dans la myasthénie [Wakkach, 1996], le récepteur à la thyréostimuline ou TSH (*thyroid-stimulating hormone*) dans la maladie de Grave [Murakami, 1996] et la chaîne α3 du collagène de type IV dans le syndrome de Goodspature [Wong, 2001]. Plus étroitement, des travaux ont montré l'expression thymique des ARNm de la Dsg3 [Schafer, 1994; Tsunoda, 2002] et nos analyses par PCR

ont confirmés l'existence des transcrits *DSG3* dans le thymus. Les données sur la Dsg4 sont plus controversées puisque les messagers *DSG4* sont détectés dans le thymus humain par des analyses de *southern-blot* [Kljuic, 2003], mais pas par celles réalisées par PCR [Whittock, 2003].

La démonstration de la transcription du gène *DSG1* dans le thymus suggère que des peptides dérivés de la Dsg1 peuvent être présentés aux cellules T en maturation ce qui pourrait conduire soit à une délétion clonale des cellules T autoréactives soit à une sélection positive de cellules T régulatrices et spécifiques de la Dsg1. Toutefois, étant donné que des lymphocytes T matures dirigés contre la Dsg1 sont présents non seulement chez les malades atteints de PF mais aussi chez les sujets sains [Gebhard, 2005], l'expression thymique des transcrits *DSG1* n'aboutit pas nécessairement à la suppression des cellules T spécifiques de la Dsg1. Cette potentielle discordance entre l'expression thymique d'un ARNm codant pour un autoAg et la tolérisation des cellules T spécifiques de celui-ci est démontrée pour la sous-unité α de l'ATPase H+/K+ exprimée à la membrane gastrique et qui constitue l'une des cibles majeures de la réponse lymphocytaire T CD4+ au cours de la gastrite auto-immune [Allen, 2005]. Alternativement, une hypothèse intéressante est que l'expression des transcrits de la Dsg1 dans le thymus induirait le développement de lymphocytes T régulateurs plutôt que l'émimination des cellules T autoréactives vis à vis de la Dsg1. A cet égard, il est intéressant de rappeler que des cellules régulatrices Tr1 spécifiques de la Dsg3 et exprimant la molécule Foxp3 sont moins fréquemment détectés chez les malades atteints de PV que chez les sujets sains [Veldman, 2004]. Ainsi, cette population de cellules Tr1 participerait-elle à la maintenance de la tolérance périphérique vis à vis de la Dsg3.

Nous avons ensuite sélectionnés 9 thymus au hasard, couvrant différents âges et analysés par PCR quantitative l'expression relative de l'ARNm *DSG1*. De façon supprenante, nos résultats indiquent que l'expression thymique des transcrits de la Dsg1 augmente avec l'âge. Ceux-ci sont d'autant plus étonant que des travaux similaires réalisés sur d'autres autoAg ont montré soit une variation interindividuelle indépendante de l'âge [Bruno, 2002], soit une diminution de l'expression des messagers codant ces autoAg avec l'âge [Sospreda, 1998], et qu'il n'existe pas d'autre exemple de transcrit d'autoAg dont l'expression thymique s'accroît avec l'âge. Par ailleurs, nos résultats semblent en contradiction avec le fait que le nombre de cellules dans le thymus diminue avec son involution âge-dépendante notamment, celui des CPA thymiques exprimant et capables de présenter des peptides du soi. En effet, les réductions des espaces épithéliaux (cortex et médullaire thymique) et du nombre de cellules dendritiques sont des caractéristiques du thymus involutif [Bertho, 1997; Nakahama, 1990]. Bien que le mécanisme à l'origine de cette augmentation des transcrits *DSG1* dans le thymus ne soit

pas encore élucidé, il est possible d'envisager certaines hypothèses pour rendre compte de ce phénomène : (i) intrinséquement, les cellules exprimant ces messagers pourraient réguler de manière positive la transcription du gène *DSG1* avec l'âge. Malgré l'absence à ce jour de la démonstration d'une augmentation de l'expression thymique d'un transcrit codant pour un autoAg, il est essentiel de mentionner que le processus d'involution thymique s'accompagne de changements importants dans l'expression génique. En effet, une analyse comparative du transcriptome de thymus chez des souris âgées de 1, 6, 12 et 24 mois met en évidence des variations dans l'expression de 788 gènes avec l'âge des animaux. A titre d'exemple, la comparaison entre les analyses transcriptomiques des groupes de souris âgées de 1 et 24 mois montrent que l'expression de 418 gènes est augmentée et que celle de 370 gènes est réprimée [Taub, 2005]. De plus, plusieurs travaux menés chez l'homme ont démontré l'augmentation de la production des ARNm codant pour certaines molécules telles que des cytokines impliquées dans la suppression de la thymopoeïse [Sempowski, 2000] ou le récepteur TLR4 [Bernasconi, 2005] avec l'involution thymique; (ii) le nombre de cellules exprimant les transcrits *DSG1* pourraient s'élever avec l'involution thymique. A cet égard, il est nécessaire de rappeler que plusieurs travaux ont démontré une augmentation âge-dépendante du nombre de cellules B présentes dans le thymus [Flores, 2001; Weerkamp, 2005].

Afin d'identifier la ou les population(s) de cellules thymiques exprimant potentiellement la Dsg1 au niveau protéique, nous avons débuté des analyses de comarquage par immunofluorescence indirecte sur des coupes de thymus humain avec notre Acm anti-Dsg1 1N5. Les résultats préliminaires montrent que l'Acm 1N5 reconnaît une population de cellules localisées principalement dans la médullaire et également présentes dans les espaces périvasculaires du thymus humain. Les expériences de comarquage indiquent que les cellules Dsg1-positives ne correspondent pas à des CET, ni à des cellules dendritiques ou à des macrophages mais à des cellules exprimant les molécules CD63 et CD19 donc, à une sous-population de lymphocytes B thymiques. Ces résultats, encore fragiles, nécessitent d'être confirmés par des expériences complémentaires utilisant d'autres sondes spécifiques des cellules B (un Acm anti-CD20 ou anti-CD21 par exemple) et de la Dsg1 (l'Acm anti-Dsg1 1D8 par exemple) afin contrôler la spécificité des marquages que nous avons observés. Par ailleurs, une analyse de comarquage avec des Acm anti-classe I et II du CMH avec un anti-Dsg1 permettrait de vérifier si ces cellules ont la capacité de présenter des peptides du soi en l'occurrence, ceux dérivés de la Dsg1. Dans l'affirmative, puisque le nombre de lymphocytes B présente dans le thymus s'accroît avec son involution, l'expression de la Dsg1 par ces cellules CD19+CD63+ pourrait en partie expliquer l'augmentation de l'expression thymique des transcrits *DSG1* en fonction de l'âge.

Au regard des quelques travaux ayant démontré la restriction de l'expression thymique d'un autoAg à son variant alternatif, nous avons tenté de déterminer si les transcrits alternatifs de la Dsg1 sont aussi exprimés dans le thymus. Les résultats obtenus à l'heure actuelle sur un faible effectif (n=10), comprenant des thymus âgés de 7 jours à 11 ans (moyenne de 2,15 ± 3,5 ans) révèle la présence des ARNm alternatifs *DSG1* sur l'ensemble des fragments thymiques analysés (100%). Les analyses se poursuivront par PCR classique sur l'ensemble des échantillons dont nous disposons (n=32) et par PCR quantitative sur les 9 échantillons déjà selectionnés pour l'amplification de l'ADNc *DSG1* afin d'éxaminer l'expression des messagers alternatifs de la Dsg1 en fonction de l'âge.

CONCLUSION

Bien que les pemphigus soient des maladies complexes, dites multifactorielles, qui résultent de l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux, ce travail de thèse plaide en faveur de l'intervention d'un autoAg clé, la Dsg1, dans les mécanismes physiopathologiques qui concourent au développement de certaines variétés de pemphigus. Nos résultats fournissent en effet de solides arguments permettant de soutenir le concept du rôle de la Dsg1 dans le processus auto-immun à la base de maladie. En premier lieu, la démonstration d'une réponse lymphocytaire T dirigée contre un épitope spécifique d'une isoforme soluble de la Dsg1 chez les malades de PF illustre la possibilité que cet autoAg modifié par épissage alternatif, associé à une prédisposition génétique liée notamment au *locus* HLA, puisse intervenir dans la rupture de la tolérance au niveau du compartiment T et *in fine*, conduire à l'initiation d'une réponse auto-immune B dirigée contre la Dsg1 *via* une extension épitopique intramoléculaire. Dans un second temps et en accord avec notre modèle expérimental murin, la réponse B anti-Dsg1 pourrait s'étendre à d'autres protéines du desmosome en particulier, les plakines, selon un mécanisme d'extension épitopique intermoléculaire et refléterait ainsi la diversité de la réponse auto-immune B observée au cours du PPN. Enfin, puisque les transcrits *DSG1* sont physiologiquement exprimés dans le thymus humain, une tolérance immune vis à vis de la Dsg1 peut en principe s'établir, signifiant que l'absence de l'expression thymique de cette autoAg ne constitue pas l'origine de la rupture de la tolérance qui concoure au développement des PS.

REFERENCES

REFERENCES

-A-

Aboobaker, J., Morar, N., Ramdial, P. K., and Hammond, M. G. (2001). Pemphigus in South Africa. Int J Dermatol *40*, 115-119.

Abreu-Velez, A. M., Beutner, E. H., Montoya, F., Bollag, W. B., and Hashimoto, T. (2003a). Analyses of autoantigens in a new form of endemic pemphigus foliaceus in Colombia. J Am Acad Dermatol *49*, 609-614.

Abreu-Velez, A. M., Hashimoto, T., Bollag, W. B., Tobon Arroyave, S., Abreu-Velez, C. E., Londono, M. L., Montoya, F., and Beutner, E. H. (2003b). A unique form of endemic pemphigus in northern Colombia. J Am Acad Dermatol *49*, 599-608.

Ahmed, A. R., Mohimen, A., Yunis, E. J., Mirza, N. M., Kumar, V., Beutner, E. H., and Alper, C. A. (1993). Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. J Exp Med *177*, 419-424.

Ahmed, A. R., Wagner, R., Khatri, K., Notani, G., Awdeh, Z., Alper, C. A., and Yunis, E. J. (1991). Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 5056-5060.

Ahmed, A. R., Yunis, E. J., Khatri, K., Wagner, R., Notani, G., Awdeh, Z., and Alper, C. A. (1990). Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 7658-7662.

Aho, S. (2004). Plakin proteins are coordinately cleaved during apoptosis but preferentially through the action of different caspases. Exp Dermatol *13*, 700-707.

Aho, S., Rothenberger, K., Tan, E. M., Ryoo, Y. W., Cho, B. H., McLean, W. H., and Uitto, J. (1999). Human periplakin: genomic organization in a clonally unstable region of chromosome 16p with an abundance of repetitive sequence elements. Genomics *56*, 160-168.

Akiyama, M., Hashimoto, T., Sugiura, M., and Nishikawa, T. (1991). Ultrastructural localization of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens in cultured human squamous carcinoma cells. Br J Dermatol *125*, 233-237.

Alarcon-Segovia, D., Llorente, L., and Ruiz-Arguelles, A. (1996a). The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. J Autoimmun *9*, 295-300.

Alarcon-Segovia, D., Ruiz-Arguelles, A., and Llorente, L. (1996b). Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. Immunol Today *17*, 163-164.

Allen, S., Read, S., DiPaolo, R., McHugh, R. S., Shevach, E. M., Gleeson, P. A., and van Driel, I. R. (2005). Promiscuous thymic expression of an autoantigen gene does not result in negative selection of pathogenic T cells. J Immunol *175*, 5759-5764.

Almeras, L., Lefranc, D., Drobecq, H., de Seze, J., Dubucquoi, S., Vermersch, P., and Prin, L. (2004). New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. Proteomics *4*, 2184-2194.

Alvarado-Flores, E., Avalos-Diaz, E., Diaz, L. A., and Herrera-Esparza, R. (2001). Anti-idiotype antibodies neutralize in vivo the blistering effect of Pemphigus foliaceus IgG. Scand J Immunol *53*, 254-258.

Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K. J., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1995a). Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. J Invest Dermatol *104*, 895-901.

Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1994). Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. J Clin Invest *94*, 59-67.

Amagai, M., Ishii, K., Hashimoto, T., Gamou, S., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1995b). Conformational epitopes of pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) are calcium dependent and glycosylation independent. J Invest Dermatol *105*, 243-247.

Amagai, M. (1995c). Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. J Invest Dermatol *104*, 146-152.

Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. Cell *67*, 869-877.

Amagai, M., Koch, P. J., Nishikawa, T., and Stanley, J. R. (1996). Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. J Invest Dermatol *106*, 351-355.

Amagai, M., Komai, A., Hashimoto, T., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Yamada, T., Kitajima, Y., Ohya, K., Iwanami, H., and Nishikawa, T. (1999a). Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. Br J Dermatol *140*, 351-357.

Amagai, M., Nishikawa, T., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., and Hashimoto, T. (1998). Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. J Clin Invest *102*, 775-782.

Amagai, M., Tsunoda, K., Suzuki, H., Nishifuji, K., Koyasu, S., and Nishikawa, T. (2000). Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J Clin Invest *105*, 625-631.

Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., and Nishikawa, T. (1999b). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. J Am Acad Dermatol *40*, 167-170.

Anand, I. S., Ganguly, N. K., Khanna, A. K., Chakravarti, R. N., and Wahi, P. L. (1983). Pathogenesis of immune-mediated carditis in monkeys. Adv Myocardiol *4*, 215-226.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., and Mathis, D. (2005a). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. Immunity *23*, 227-239.

Anderson, M. S., and Bluestone, J. A. (2005b). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. Annu Rev Immunol *23*, 447-485.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. Science *298*, 1395-1401.

Anhalt, G. J. (1989). Drug-induced pemphigus. Semin Dermatol *8*, 166-172.

Anhalt, G. J. (1997). Paraneoplastic pemphigus. Adv Dermatol *12*, 77-96; discussion 97.

Anhalt, G. J. (2001a). Paraneoplastic pemphigus: the role of tumours and drugs. Br J Dermatol *144*, 1102-1104.

Anhalt, G. J. (2004). Paraneoplastic pemphigus. J Investig Dermatol Symp Proc *9*, 29-33.

Anhalt, G. J., and Diaz, L. A. (2001b). Prospects for autoimmune disease: Research advances in pemphigus. Jama *285*, 652-654.

Anhalt, G. J., Kim, S. C., Stanley, J. R., Korman, N. J., Jabs, D. A., Kory, M., Izumi, H., Ratrie, H., 3rd, Mutasim, D., Ariss-Abdo, L., and et al. (1990). Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune

mucocutaneous disease associated with neoplasia. N Engl J Med *323*, 1729-1735.

Anhalt, G. J., Labib, R. S., Voorhees, J. J., Beals, T. F., and Diaz, L. A. (1982). Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med *306*, 1189-1196.

Anzai, H., Stanley, J. R., and Amagai, M. (2006). Production of low titers of anti-desmoglein 1 IgG autoantibodies in some patients with staphylococcal scalded skin syndrome. J Invest Dermatol *126*, 2139-2141.

Aoki-Ota, M., Kinoshita, M., Ota, T., Tsunoda, K., Iwasaki, T., Tanaka, S., Koyasu, S., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2006). Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. J Invest Dermatol *126*, 105-113.

Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Ota, T., Iwasaki, T., Koyasu, S., Amagai, M., and Nishikawa, T. (2004). A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. Br J Dermatol *151*, 346-354.

Aoki, V., Millikan, R. C., Rivitti, E. A., Hans-Filho, G., Eaton, D. P., Warren, S. J., Li, N., Hilario-Vargas, J., Hoffmann, R. G., and Diaz, L. A. (2004). Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Investig Dermatol Symp Proc *9*, 34-40.

Aoyama, Y., Owada, M. K., and Kitajima, Y. (1999a). A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. Eur J Immunol *29*, 2233-2240.

Aoyama, Y., and Kitajima, Y. (1999b). Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. J Invest Dermatol *112*, 67-71.

Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Karaouni, A., and Grando, S. A. (2005). Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus. Am J Pathol *167*, 1531-1544.

Asano, S., Seishima, M., and Kitajima, Y. (2001). Phosphatidylinositol-specific-phospholipase C cleaves urokinase plasminogen activator receptor from the cell surface and leads to inhibition of pemphigus-IgG-induced acantholysis in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. Clin Exp Dermatol *26*, 289-295.

Atsumi, T., Tsutsumi, A., Amengual, O., Khamashta, M. A., Hughes, G. R., Miyoshi, Y., Ichikawa, K., and Koike, T. (1999). Correlation between beta2-glycoprotein I valine/leucine247 polymorphism and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome. Rheumatology (Oxford) *38*, 721-723.

Avalos-Diaz, E., Olague-Marchan, M., Lopez-Swiderski, A., Herrera-Esparza, R., and Diaz, L. A. (2000). Transplacental passage of maternal pemphigus foliaceus autoantibodies induces neonatal pemphigus. J Am Acad Dermatol *43*, 1130-1134.

Ayed, M. B., Martel, P., Zitouni, M., Gilbert, D., Turki, H., Mokni, M., Osman, A. B., Kamoun, M. R., Zahaf, A., Makni, S., *et al.* (2002). Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with desmoglein 1 gene polymorphism. Genes Immun *3*, 378-379.

-B-

Bain, S. C., Prins, J. B., Hearne, C. M., Rodrigues, N. R., Rowe, B. R., Pritchard, L. E., Ritchie, R. J., Hall, J. R., Undlien, D. E., Ronningen, K. S., and et al. (1992). Insulin gene region-encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA-DR4-positive individuals. Nat Genet *2*, 212-215.

Bannon, L. J., Cabrera, B. L., Stack, M. S., and Green, K. J. (2001). Isoform-specific differences in the size of desmosomal cadherin/catenin complexes. J Invest Dermatol *117*, 1302-1306.

Baroni, A., Buommino, E., Paoletti, I., Orlando, M., Ruocco, E., and Ruocco, V. (2004). Pemphigus serum and captopril induce heat shock protein 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression, triggering apoptosis in human keratinocytes. Br J Dermatol *150*, 1070-1080.

Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E. D., Valenzuela, J. G., Charlab, R., Barral-Netto, M., and Ribeiro, J. M. (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? Am J Trop Med Hyg *62*, 740-745.

Bastuji-Garin, S., Souissi, R., Blum, L., Turki, H., Nouira, R., Jomaa, B., Zahaf, A., Ben Osman, A., Mokhtar, I., Fazaa, B., and et al. (1995). Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. J Invest Dermatol *104*, 302-305.

Bastuji-Garin, S., Turki, H., Mokhtar, I., Nouira, R., Fazaa, B., Jomaa, B., Zahaf, A., Osman, A. B., Souissi, R., Hemon, D., *et al.* (2002). Possible relation of Tunisian pemphigus with traditional cosmetics: a multicenter case-control study. Am J Epidemiol *155*, 249-256.

Bedane, C., Prost, C., Thomine, E., Intrator, L., Joly, P., Caux, F., Blecker, M., Bernard, P., Leboutet, M. J., Tron, F., *et al.* (1996). Binding of autoantibodies is not restricted to desmosomes in pemphigus vulgaris: comparison of 14 cases of pemphigus vulgaris and 10 cases of pemphigus foliaceus studied by western immunoblot and immunoelectron microscopy. Arch Dermatol Res *288*, 343-352.

Beletskaya, L. V., and Gnesditskaya, E. V. (1980). Detection of squamous epithelial intercellular substance antigen(s) in Hassall's corpuscles of human and animal thymus. Scand J Immunol *12*, 93-98.

Bell, G. I., Horita, S., and Karam, J. H. (1984). A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes *33*, 176-183.

Bellone, M., Iezzi, G., Rovere, P., Galati, G., Ronchetti, A., Protti, M. P., Davoust, J., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. J Immunol *159*, 5391-5399.

Bennett, S. T., Lucassen, A. M., Gough, S. C., Powell, E. E., Undlien, D. E., Pritchard, L. E., Merriman, M. E., Kawaguchi, Y., Dronsfield, M. J., Pociot, F., and et al. (1995). Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. Nat Genet *9*, 284-292.

Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L. A., Enghild, J. J., Chua, M. P., and Rubenstein, D. S. (2005). Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. J Biol Chem *280*, 23778-23784.

Bernasconi, P., Barberis, M., Baggi, F., Passerini, L., Cannone, M., Arnoldi, E., Novellino, L., Cornelio, F., Mantegazza, R. (2005). Increased toll-like receptor 4 expression in thymus of myasthenic patients with thymitis and thymic involution. Am J Pathol *167*, 129-139

Bertho, J. M., Demarquay, C., Moulian, N., Van Der Meeren, A., Berrih-Aknin, S., and Gourmelon, P. (1997). Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. Cell Immunol *179*, 30-40.

Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. Nature *430*, 257-263.

Beutner, E. H., Lever, W. F., Witebsky, E., Jordon, R., and Chertock, B. (1965). Autoantibodies In Pemphigus Vulgaris: Response To An Intercellular Substance Of Epidermis. Jama *192*, 682-688.

Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. Annu Rev Biochem *72*, 291-336.

Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain

structure and implications for cell adhesion mechanisms. Science *296*, 1308-1313.

Bonifacio, E., Lampasona, V., and Bingley, P. J. (1998). IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. J Immunol *161*, 2648-2654.

Bonne, S., Gilbert, B., Hatzfeld, M., Chen, X., Green, K. J., and van Roy, F. (2003). Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. J Cell Biol *161*, 403-416.

Bornslaeger, E. A., Godsel, L. M., Corcoran, C. M., Park, J. K., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A. P., and Green, K. J. (2001). Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. J Cell Sci *114*, 727-738.

Borradori, L., Trueb, R. M., Jaunin, F., Limat, A., Favre, B., and Saurat, J. H. (1998). Autoantibodies from a patient with paraneoplastic pemphigus bind periplakin, a novel member of the plakin family. J Invest Dermatol *111*, 338-340.

Bowen, G. M., Peters, N. T., Fivenson, D. P., Su, L. D., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., Cooper, K. D., and Stevens, S. R. (2000). Lichenoid dermatitis in paraneoplastic pemphigus: a pathogenic trigger of epitope spreading? Arch Dermatol *136*, 652-656.

Brandsen, R., Frusic-Zlotkin, M., Lyubimov, H., Yunes, F., Michel, B., Tamir, A., Milner, Y., and Brenner, S. (1997). Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. J Am Acad Dermatol *36*, 44-52.

Brenner, S., Ruocco, V., Ruocco, E., Russo, A., Tur, E., Luongo, V., and Lombardi, M. L. (2000). In vitro tannin acantholysis. Int J Dermatol *39*, 738-742.

Brenner, S., Ruocco, V., Wolf, R., de Angelis, E., and Lombardi, M. L. (1995). Pemphigus and dietary factors. In vitro acantholysis by allyl compounds of the genus Allium. Dermatology *190*, 197-202.

Brenner, S., and Wolf, R. (1994). Possible nutritional factors in induced pemphigus. Dermatology *189*, 337-339.
Bystryn, J. C. (1984). Adjuvant therapy of pemphigus. Arch Dermatol *120*, 941-951.

Bruno, R., Sabater, L., Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Escudero, D., Martinez-Caceres, E., and Pujol-Borrell, R. (2002). Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. Eur J Immunol *32*, 2737-2747.

Bystryn, J. C., and Rudolph, J. L. (2005). IVI g TREATMENT OF PEMPHIGUS: how it works and how to use it. J Invest Dermatol *125*, 1093-1098.

-C-

Caldelari, R., de Bruin, A., Baumann, D., Suter, M. M., Bierkamp, C., Balmer, V., and Muller, E. (2001). A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. J Cell Biol *153*, 823-834.

Calkins, C. C., Setzer, S. V., Jennings, J. M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M., and Kowalczyk, A. P. (2006). Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. J Biol Chem *281*, 7623-7634.

Camisa, C., and Helm, T. N. (1993). Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasia-induced autoimmune disease. Arch Dermatol *129*, 883-886.

Capon, F., Bharkhada, J., Cochrane, N. E., Mortimer, N. J., Setterfield, J. F., Reynaert, S., Black, M. M., Vaughan, R. W., Trembath, R. C., and Harman, K. E. (2006). Evidence of an association between desmoglein 3 haplotypes and pemphigus vulgaris. Br J Dermatol *154*, 67-71.

Caproni, M., Giomi, B., Cardinali, C., Salvatore, E., Pestelli, E., D'Agata, A., Bianchi, B., Toto, P., Feliciani, C., and Fabbri, P. (2001). Further support for a role for Th2-like cytokines in blister formation of pemphigus. Clin Immunol *98*, 264-271.

Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. J Exp Med *179*, 1317-1330.

Casiano, C. A., Martin, S. J., Green, D. R., and Tan, E. M. (1996). Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. J Exp Med *184*, 765-770.

Chaabihi, H., Ogliastro, M. H., Martin, M., Giraud, C., Devauchelle, G., and Cerutti, M. (1993). Competition between baculovirus polyhedrin and p10 gene expression during infection of insect cells. J Virol *67*, 2664-2671.

Chan, E. K., Di Donato, F., Hamel, J. C., Tseng, C. E., and Buyon, J. P. (1995). 52-kD SS-A/Ro: genomic structure and identification of an alternatively spliced transcript encoding a novel leucine zipper-minus autoantigen expressed in fetal and adult heart. J Exp Med *182*, 983-992.

Chan, E. K., Hamel, J. C., Buyon, J. P., and Tan, E. M. (1991). Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. J Clin Invest *87*, 68-76.

Chan, L. S. (2000). Epitope spreading in paraneoplastic pemphigus: autoimmune induction in antibody-mediated blistering skin diseases. Arch Dermatol *136*, 663-664.

Cheng, S. W., Kobayashi, M., Kinoshita-Kuroda, K., Tanikawa, A., Amagai, M., and Nishikawa, T. (2002). Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. Br J Dermatol *147*, 261-265.

Chentoufi, A. A., and Polychronakos, C. (2002). Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. Diabetes *51*, 1383-1390.

Chitaev, N. A., Leube, R. E., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Franke, W. W., and Troyanovsky, S. M. (1996). The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. J Cell Biol *133*, 359-369.

Chitaev, N. A., and Troyanovsky, S. M. (1997). Direct Ca2+-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. J Cell Biol *138*, 193-201.

Choi, H. J., Park-Snyder, S., Pascoe, L. T., Green, K. J., and Weis, W. I. (2002). Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. Nat Struct Biol *9*, 612-620.

Chowdhury, M. M., and Natarajan, S. (1998). Neonatal pemphigus vulgaris associated with mild oral pemphigus vulgaris in the mother during pregnancy. Br J Dermatol *139*, 500-503.

Cirillo, N., Femiano, F., Gombos, F., and Lanza, A. (2006). Serum from pemphigus vulgaris reduces desmoglein 3 half-life and perturbs its de novo assembly to desmosomal sites in cultured keratinocytes. FEBS Lett *580*, 3276-3281.

Clough, J. D. (1992). Role of autoantibodies and immune complexes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Clin Apher *7*, 151-152.

Cooper, T. A., and Mattox, W. (1997). The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. Am J Hum Genet *61*, 259-266.

Cudworth, A. G., and Woodrow, J. C. (1974). Letter: HL-A antigens and diabetes mellitus. Lancet *2*, 1153.

Darnell, R. B. (1996). Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 4529-4536.

-D-

David, M., Weissman-Katzenelson, V., Ben-Chetrit, A., Hazaz, B., Ingber, A., and Sandbank, M. (1989). The usefulness of immunofluorescent tests in pemphigus patients in clinical remission. Br J Dermatol *120*, 391-395.

Davidoff, A. M., Iglehart, J. D., and Marks, J. R. (1992). Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 3439-3442.

Delaporte, E., Piette, F., and Bergoend, H. (1991). [Pemphigus vulgaris induced by radiotherapy]. Ann Dermatol Venereol *118*, 447-451.

Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhahn, M., Peltonen, L., Walter, J., and Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. J Exp Med *202*, 33-45.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nat Immunol *2*, 1032-1039.

Diaz, L. A., Arteaga, L. A., Hilario-Vargas, J., Valenzuela, J. G., Li, N., Warren, S., Aoki, V., Hans-Filho, G., Eaton, D., dos Santos, V., *et al.* (2004). Anti-desmoglein-1 antibodies in onchocerciasis, leishmaniasis and Chagas disease suggest a possible etiological link to Fogo selvagem. J Invest Dermatol *123*, 1045-1051.

Diaz, L. A., Sampaio, S. A., Rivitti, E. A., Martins, C. R., Cunha, P. R., Lombardi, C., Almeida, F. A., Castro, R. M., Macca, M. L., Lavrado, C., and et al. (1989). Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. J Invest Dermatol *92*, 4-12.

Diez, J., Park, Y., Zeller, M., Brown, D., Garza, D., Ricordi, C., Hutton, J., Eisenbarth, G. S., and Pugliese, A. (2001). Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. Diabetes *50*, 895-900.

Ding, X., Aoki, V., Mascaro, J. M., Jr., Lopez-Swiderski, A., Diaz, L. A., and Fairley, J. A. (1997). Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. J Invest Dermatol *109*, 592-596.

Djabiri, F., Caillat-Zucman, S., Gajdos, P., Jais, J. P., Gomez, L., Khalil, I., Charron, D., Bach, J. F., and Garchon, H. J. (1997). Association of the AChRalpha-subunit gene (CHRNA), DQA1*0101, and the DR3 haplotype in myasthenia gravis. Evidence for a three-gene disease model in a subgroup of patients. J Autoimmun *10*, 407-413.

Doyle, H. A., and Mamula, M. J. (2002). Posttranslational protein modifications: new flavors in the menu of autoantigens. Curr Opin Rheumatol *14*, 244-249.

Dogra, R.S., Vaidyanathan, P., Prabakar, K.R., Marshall, K.E., Hutton, J.C., and Pugliese, A. (2006). Alternative splicing of G6PC2, the gene coding for the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP), results in differential expression in human thymus and spleen compared with pancreas. Diabetologia *49*, 953-957.

Dusek, R. L., Getsios, S., Chen, F., Park, J. K., Amargo, E. V., Cryns, V. L., and Green, K. J. (2006). The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes. J Biol Chem *281*, 3614-3624.

-E-

Eaton, D. P., Diaz, L. A., Hans-Filho, G., Santos, V. D., Aoki, V., Friedman, H., Rivitti, E. A., Sampaio, S. A., Gottlieb, M. S., Giudice, G. J., *et al.* (1998). Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. J Med Entomol *35*, 120-131.

Eger, A., Stockinger, A., Wiche, G., and Foisner, R. (1997). Polarisation-dependent association of plectin with desmoplakin and the lateral submembrane skeleton in MDCK cells. J Cell Sci *110 (Pt 11)*, 1307-1316.

Elkon, K., Skelly, S., Parnassa, A., Moller, W., Danho, W., Weissbach, H., and Brot, N. (1986). Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci U S A *83*, 7419-7423.

Elliott, C. E., Becker, B., Oehler, S., Castanon, M. J., Hauptmann, R., and Wiche, G. (1997). Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. Genomics *42*, 115-125.

Emery, D. J., Diaz, L. A., Fairley, J. A., Lopez, A., Taylor, A. F., and Giudice, G. J. (1995). Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1. J Invest Dermatol *104*, 323-328.

Erikson, J., Radic, M. Z., Camper, S. A., Hardy, R. R., Carmack, C., and Weigert, M. (1991). Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. Nature *349*, 331-334.

Esaki, C., Seishima, M., Yamada, T., Osada, K., and Kitajima, Y. (1995). Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-trisphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. J Invest Dermatol *105*, 329-333.

Eymard, B., and Chillet, P. (1997). [Autoimmune myasthenia: recent physiopathological data]. Presse Med *26*, 872-879.

-F-

Fan, J. L., Memar, O., McCormick, D. J., and Prabhakar, B. S. (1999). BALB/c mice produce blister-causing antibodies upon immunization with a recombinant human desmoglein 3. J Immunol *163*, 6228-6235.

Felgner, P. L., and Ringold, G. M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. Nature *337*, 387-388.

Fitzpatrick, R. E., and Newcomer, V. D. (1980). The correlation of disease activity and antibody titers in pemphigus. Arch Dermatol *116*, 285-290.

Flores, K. G., Li, J., and Hale, L. P. (2001). B cells in epithelial and perivascular compartments of human adult thymus. Hum Pathol *32*, 926-934.

Foedinger, D., Anhalt, G. J., Boecskoer, B., Elbe, A., Wolff, K., and Rappersberger, K. (1995). Autoantibodies to desmoplakin I and II in patients with erythema multiforme. J Exp Med *181*, 169-179.

Foedinger, D., Elbe-Burger, A., Sterniczky, B., Lackner, M., Horvat, R., Wolff, K., and Rappersberger, K. (1998). Erythema multiforme associated human autoantibodies against desmoplakin I and II: biochemical characterization and passive transfer studies into newborn mice. J Invest Dermatol *111*, 503-510.

Fontao, L., Favre, B., Riou, S., Geerts, D., Jaunin, F., Saurat, J. H., Green, K. J., Sonnenberg, A., and Borradori, L. (2003). Interaction of the bullous pemphigoid antigen 1 (BP230) and desmoplakin with intermediate filaments is mediated by distinct sequences within their COOH terminus. Mol Biol Cell *14*, 1978-1992.

Frank, J., Cserhalmi-Friedman, P. B., Ahmad, W., Panteleyev, A. A., Aita, V. M., and Christiano, A. M. (2001). Characterization of the desmosomal cadherin gene family: genomic organization of two desmoglein genes on human chromosome 18q12. Exp Dermatol *10*, 90-94.

Friedman, H., Campbell, I., Rocha-Alvarez, R., Ferrari, I., Coimbra, C. E., Moraes, J. R., Flowers, N. M., Stastny, P., Fernandez-Vina, M., Olague-Alcala, M., and et al. (1995). Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. J Am Acad Dermatol *32*, 949-956.

Fritz, R. B., and Zhao, M. L. (1994). Encephalitogenicity of myelin basic protein exon-2 peptide in mice. J Neuroimmunol *51*, 1-6.

Fujiwara, S., Kohno, K., Iwamatsu, A., Naito, I., and Shinkai, H. (1996). Identification of a 450-kDa human epidermal autoantigen as a new member of the plectin family. J Invest Dermatol *106*, 1125-1130.

Fujiwara, S., Takeo, N., Otani, Y., Parry, D. A., Kunimatsu, M., Lu, R., Sasaki, M., Matsuo, N., Khaleduzzaman, M., and Yoshioka, H. (2001). Epiplakin, a novel member of the Plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen. Structure and tissue localization. J Biol Chem *276*, 13340-13347.

Futei, Y., Amagai, M., Hashimoto, T., and Nishikawa, T. (2003). Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol *49*, 1023-1028.

Futei, Y., Amagai, M., Sekiguchi, M., Nishifuji, K., Fujii, Y., and Nishikawa, T. (2000). Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol *115*, 829-834.

-G-

Garchon, H. J., Djabiri, F., Viard, J. P., Gajdos, P., and Bach, J. F. (1994). Involvement of human muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene (CHRNA) in susceptibility to myasthenia gravis. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 4668-4672.

Gardnerova, M., Eymard, B., Morel, E., Faltin, M., Zajac, J., Sadovsky, O., Tripon, P., Domergue, M., Vernet-der Garabedian, B., and Bach, J. F. (1997). The fetal/adult acetylcholine receptor antibody ratio in mothers with myasthenia gravis as a marker for transfer of the disease to the newborn. Neurology *48*, 50-54.

Garrod, D., Chidgey, M., and North, A. (1996). Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. Curr Opin Cell Biol *8*, 670-678.

Gazit, E., Slomov, Y., Goldberg, I., Brenner, S., and Loewenthal, R. (2004). HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. Hum Immunol *65*, 39-46.

Gebhard, K. L., Veldman, C. M., Wassmuth, R., Schultz, E., Schuler, G., and Hertl, M. (2005). Ex vivo analysis of desmoglein 1-responsive T-helper (Th) 1 and Th2 cells in patients with pemphigus foliaceus and healthy individuals. Exp Dermatol *14*, 586-592.

Geenen, V., Warzee, E., Moutschen, M., and Legros, J. J. (2001). [Autoimmune thyroiditis]. Rev Med Liege *56*, 72-78.

Gilbert, D., Courville, P., Brard, F., Joly, P., Petit, S., Bernardi, E., Schoofs, A. R., Lauret, P., and Tron, F. (1997). A complementarity-determining region peptide of an anti-desmosome autoantibody may interact with the desmosomal plaque through molecular mimicry with a cytoplasmic desmoglein 1 sequence. Eur J Immunol *27*, 1055-1060.

Godsel, L. M., Hsieh, S. N., Amargo, E. V., Bass, A. E., Pascoe-McGillicuddy, L. T., Huen, A. C., Thorne, M. E., Gaudry, C. A., Park, J. K., Myung, K., *et al.* (2005). Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. J Cell Biol *171*, 1045-1059.

Gonzalez-Escribano, M. F., Jimenez, G., Walter, K., Montes, M., Perez-Bernal, A. M., Rodriguez, M. R., Conejo-Mir, J. S., and Nunez-Roldan, A. (1998). Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens *52*, 275-278.

Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C. G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature *435*, 590-597.

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J. J., and Madjar, J. J. (1997). Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. Electrophoresis *18*, 328-337.

Gotter, J., Brors, B., Hergenhahn, M., and Kyewski, B. (2004). Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. J Exp Med *199*, 155-166.

Grando, S. A. (2000). Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. Dermatology *201*, 290-295.

Griem, P., and Gleichmann, E. (1995). Metal ion induced autoimmunity. Curr Opin Immunol *7*, 831-838.

Groot, K. R., Sevilla, L. M., Nishi, K., DiColandrea, T., and Watt, F. M. (2004). Kazrin, a novel periplakin-interacting protein associated with desmosomes and the keratinocyte plasma membrane. J Cell Biol *166*, 653-659.

-H-

Hacker-Foegen, M. K., Fairley, J. A., and Lin, M. S. (2003). T cell receptor gene usage in desmoglein-3-specific T lymphocytes from patients with pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol *121*, 1365-1372.

Hacker, M. K., Janson, M., Fairley, J. A., and Lin, M. S. (2002). Isotypes and antigenic profiles of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies. Clin Immunol *105*, 64-74.

Hale, E. K., and Bystryn, J. C. (2001). Laryngeal and nasal involvement in pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol *44*, 609-611.

Hanakawa, Y., Amagai, M., Shirakata, Y., Sayama, K., and Hashimoto, K. (2000). Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. J Cell Sci *113 (Pt 10)*, 1803-1811.

Hanakawa, Y., Li, H., Lin, C., Stanley, J. R., and Cotsarelis, G. (2004). Desmogleins 1 and 3 in the companion layer anchor mouse anagen hair to the follicle. J Invest Dermatol *123*, 817-822.

Hanakawa, Y., Matsuyoshi, N., and Stanley, J. R. (2002). Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion. J Invest Dermatol *119*, 27-31.

Hans-Filho, G., Aoki, V., Rivitti, E., Eaton, D. P., Lin, M. S., and Diaz, L. A. (1999). Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)--1998. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Clin Dermatol *17*, 225-235; discussion 105-226.

Harman, K. E., Gratian, M. J., Bhogal, B. S., Challacombe, S. J., and Black, M. M. (2000). A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences in frequency and the association with a more severe phenotype. Br J Dermatol *143*, 343-348.

Harman, K. E., Seed, P. T., Gratian, M. J., Bhogal, B. S., Challacombe, S. J., and Black, M. M. (2001). The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. Br J Dermatol *144*, 775-780.

Hashimoto, K., Shafran, K. M., Webber, P. S., Lazarus, G. S., and Singer, K. H. (1983). Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A

mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. J Exp Med *157*, 259-272.

Hashimoto, T. (2003). Recent advances in the study of the pathophysiology of pemphigus. Arch Dermatol Res *295 Suppl 1*, S2-11.

Hashimoto, T., Amagai, M., Watanabe, K., Chorzelski, T. P., Bhogal, B. S., Black, M. M., Stevens, H. P., Boorsma, D. M., Korman, N. J., Gamou, S., and et al. (1995). Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. J Invest Dermatol *104*, 829-834.

Haskins, K., and Wegmann, D. (1996). Diabetogenic T-cell clones. Diabetes *45*, 1299-1305.

Hatzfeld, M. (2006). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? Biochim Biophys Acta.

He, W., Cowin, P., and Stokes, D. L. (2003). Untangling desmosomal knots with electron tomography. Science *302*, 109-113.

Heath, V. L., Moore, N. C., Parnell, S. M., and Mason, D. W. (1998). Intrathymic expression of genes involved in organ specific autoimmune disease. J Autoimmun *11*, 309-318.

Helou, J., Allbritton, J., and Anhalt, G. J. (1995). Accuracy of indirect immunofluorescence testing in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol *32*, 441-447.

Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., *et al.* (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. Int Immunol *13*, 695-704.

Hertl, M., Amagai, M., Sundaram, H., Stanley, J., Ishii, K., and Katz, S. I. (1998a). Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol *110*, 62-66.

Hertl, M., Karr, R. W., Amagai, M., and Katz, S. I. (1998b). Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol *110*, 388-392.

Hilario-Vargas, J., Dasher, D. A., Li, N., Aoki, V., Hans-Filho, G., dos Santos, V., Qaqish, B. F., Rivitti, E. A., and Diaz, L. A. (2006). Prevalence of anti-desmoglein-3 antibodies in endemic regions of Fogo selvagem in Brazil. J Invest Dermatol *126*, 2044-2048.

Hirose, N., Williams, R., Alberts, A. R., Furie, R. A., Chartash, E. K., Jain, R. I., Sison, C., Lahita, R. G., Merrill, J. T., Cucurull, E., *et al.* (1999). A role for the polymorphism at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in the generation of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum *42*, 1655-1661.

Hoffman, M. A., Qiao, X., and Anhalt, G. J. (2003). CD8+ T lymphocytes in bronchiolitis obliterans, paraneoplastic pemphigus, and solitary Castleman's disease. N Engl J Med *349*, 407-408.

Hollingsworth, D. R., and Mabry, C. C. (1976). Congenital graves disease. Four familial cases with long-term follow-up and perspective. Am J Dis Child *130*, 148-155.

Hsiao, C. J., Hsu, M. M., Lee, J. Y., Chen, W. C., and Hsieh, W. C. (2001). Paraneoplastic pemphigus in association with a retroperitoneal Castleman's disease presenting with a lichen planus pemphigoides-like eruption. A case report and review of literature. Br J Dermatol *144*, 372-376.

Hup, J. M., Bruinsma, R. A., Boersma, E. R., and de Jong, M. C. (1986). Neonatal pemphigus vulgaris: transplacental transmission of antibodies. Pediatr Dermatol *3*, 468-472.

-I-

Inaoki, M., Kodera, M., Fujimoto, A., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., and Takehara, K. (2001). Paraneoplastic pemphigus without antidesmoglein 3 or antidesmoglein 1 autoantibodies. Br J Dermatol *144*, 610-613.

Ishii, K., Amagai, M., Hall, R. P., Hashimoto, T., Takayanagi, A., Gamou, S., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1997). Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. J Immunol *159*, 2010-2017.

Ishii, K., Amagai, M., Ohata, Y., Shimizu, H., Hashimoto, T., Ohya, K., and Nishikawa, T. (2000). Development of pemphigus vulgaris in a patient with pemphigus foliaceus: antidesmoglein antibody profile shift confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay. J Am Acad Dermatol *42*, 859-861.

Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Amagai, M. (2005). In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol *124*, 939-946.

Ishii, K., Norvell, S. M., Bannon, L. J., Amargo, E. V., Pascoe, L. T., and Green, K. J. (2001a). Assembly of desmosomal cadherins into desmosomes is isoform dependent. J Invest Dermatol *117*, 26-35.

Ishii, M., Izumi, J., Fujiwara, H., Ito, M., and Hamada, M. (2001b). Immunoblotting detection of gamma-catenin (plakoglobin) antibody in the serum of a patient with paraneoplastic pemphigus. Br J Dermatol *144*, 377-379.

-J-

Jacobsen, M., Schweer, D., Ziegler, A., Gaber, R., Schock, S., Schwinzer, R., Wonigeit, K., Lindert, R. B., Kantarci, O., Schaefer-Klein, J., *et al.* (2000). A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. Nat Genet *26*, 495-499.

James, J. A., and Harley, J. B. (1998a). B-cell epitope spreading in autoimmunity. Immunol Rev *164*, 185-200.

James, J. A., and Harley, J. B. (1998b). A model of peptide-induced lupus autoimmune B cell epitope spreading is strain specific and is not H-2 restricted in mice. J Immunol *160*, 502-508.

Jefferson, J. J., Leung, C. L., and Liem, R. K. (2004). Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. Nat Rev Mol Cell Biol *5*, 542-553.

Jolicoeur, C., Hanahan, D., and Smith, K. M. (1994). T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 6707-6711.

Joly, P., Mouquet, H., Roujeau, J. C., Gilbert, D., Gougeon, M. L., D'Incan, M., Bedane, C., Muller, M., Hertl, M., and Musette, P. Dramatic and long-lasting effect of anti-CD20 monoclonal antibody : rituximab on severe types of pemphigus. (In preparation).

Joly, P., Gilbert, D., Thomine, E., Zitouni, M., Ghohestani, R., Delpech, A., Lauret, P., and Tron, F. (1997). Identification of a new antibody population directed against a desmosomal plaque antigen in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. J Invest Dermatol *108*, 469-475.

Joly, P., Richard, C., Gilbert, D., Courville, P., Chosidow, O., Roujeau, J. C., Beylot-Barry, M., D'Incan, M., Martel, P., Lauret, P., and Tron, F. (2000). Sensitivity and specificity of clinical, histologic, and immunologic features in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol *43*, 619-626.

Joly, P., Thomine, E., Gilbert, D., Verdier, S., Delpech, A., Prost, C., Lebbe, C., Lauret, P., and Tron, F. (1994). Overlapping distribution of autoantibody specificities in paraneoplastic pemphigus and pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol *103*, 65-72.

Jordan, C. A., Friedrich, V. L., Jr., de Ferra, F., Weismiller, D. G., Holmes, K. V., and Dubois-Dalcq, M. (1990). Differential exon expression in myelin basic protein transcripts during central nervous system (CNS) remyelination. Cell Mol Neurobiol *10*, 3-18.

Juhasz, I., Lazarus, G. S., Murphy, G. F., Shih, I. M., and Herlyn, M. (1993). Development of pemphigus vulgaris-like lesions in severe combined immunodeficiency disease mice reconstituted with lymphocytes from patients. J Clin Invest *92*, 2401-2407.

Julier, C., Lucassen, A., Villedieu, P., Delepine, M., Levy-Marchal, C., Danze, P. M., Bianchi, F., Boitard, C., Froguel, P., Bell, J., and et al. (1994). Multiple DNA variant association analysis: application to the insulin gene region in type I diabetes. Am J Hum Genet *55*, 1247-1254.

-K-

Karashima, T., and Watt, F. M. (2002). Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments. J Cell Sci *115*, 5027-5037.

Karlhofer, F. M., Hashimoto, T., Slupetzky, K., Kiss, M., Liu, Y., Amagai, M., Pieczkowski, F., Foedinger, D., Kirnbauer, R., and Stingl, G. (2003). 230-kDa and 190-kDa proteins in addition to desmoglein 1 as immunological targets in a subset of pemphigus foliaceus with a combined cell-surface and basement membrane zone immune staining pattern. Exp Dermatol *12*, 646-654.

Karsai, A., Muller, S., Platz, S., and Hauser, M. T. (2002). Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. Biotechniques *32*, 790-792, 794-796.

Kawana, S., Hashimoto, T., Nishikawa, T., and Nishiyama, S. (1994). Changes in clinical features, histologic findings, and antigen profiles with development of pemphigus foliaceus from pemphigus vulgaris. Arch Dermatol *130*, 1534-1538.

Kawasaki, H., Tsunoda, K., Hata, T., Ishii, K., Yamada, T., and Amagai, M. (2006). Synergistic Pathogenic Effects of Combined Mouse Monoclonal Anti-Desmoglein 3 IgG Antibodies on Pemphigus Vulgaris Blister Formation. J Invest Dermatol.

Kazerounian, S., Mahoney, M. G., Uitto, J., and Aho, S. (2000). Envoplakin and periplakin, the paraneoplastic pemphigus antigens, are also recognized by pemphigus foliaceus autoantibodies. J Invest Dermatol *115*, 505-507.

Kennedy, G. C., German, M. S., and Rutter, W. J. (1995). The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. Nat Genet *9*, 293-298.

Kim, S. C., Kwon, Y. D., Lee, I. J., Chang, S. N., and Lee, T. G. (1997). cDNA cloning of the 210-kDa paraneoplastic pemphigus antigen reveals that envoplakin is a component of the antigen complex. J Invest Dermatol *109*, 365-369.

Kinoshita, G., Purcell, A. W., Keech, C. L., Farris, A. D., McCluskey, J., and Gordon, T. P. (1999). Molecular chaperones are targets of autoimmunity in Ro(SS-A) immune mice. Clin Exp Immunol *115*, 268-274.

Kitajima, Y., Aoyama, Y., and Seishima, M. (1999). Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell datachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. J Investig Dermatol Symp Proc *4*, 137-144.

Kitajima, Y., Inoue, S., and Yaoita, H. (1986). Effects of pemphigus antibody on the organization of microtubules and keratin-intermediate filaments in cultured human keratinocytes. Br J Dermatol *114*, 171-179.

Kiyokawa, C., Ruhrberg, C., Nie, Z., Karashima, T., Mori, O., Nishikawa, T., Green, K. J., Anhalt, G. J., DiColandrea, T., Watt, F. M., and Hashimoto, T. (1998). Envoplakin and periplakin are components of the paraneoplastic pemphigus antigen complex. J Invest Dermatol *111*, 1236-1238.

Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K., and Kyewski, B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. Nat Med *6*, 56-61.

Kljuic, A., Bazzi, H., Sundberg, J. P., Martinez-Mir, A., O'Shaughnessy, R., Mahoney, M. G., Levy, M., Montagutelli, X., Ahmad, W., Aita, V. M., *et al.* (2003). Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. Cell *113*, 249-260.

Koch, P. J., Mahoney, M. G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G. F., Whitaker-Menezes, D., and Stanley, J. R. (1997). Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. J Cell Biol *137*, 1091-1102.

Kohler, K. F., and Petzl-Erler, M. L. (2006). No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). Int J Immunogenet *33*, 141-144.

Komai, A., Amagai, M., Ishii, K., Nishikawa, T., Chorzelski, T., Matsuo, I., and Hashimoto, T. (2001). The clinical transition between pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris correlates well with the changes in autoantibody profile assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay. Br J Dermatol *144*, 1177-1182.

Korb, L. C., and Ahearn, J. M. (1997). C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. J Immunol *158*, 4525-4528.

Kotzin, B. L. (1997). Susceptibility loci for lupus: a guiding light from murine models? J Clin Invest *99*, 557-558.

Kowalczyk, A. P., Anderson, J. E., Borgwardt, J. E., Hashimoto, T., Stanley, J. R., and Green, K. J. (1995). Pemphigus sera recognize conformationally sensitive epitopes in the amino-terminal region of desmoglein-1. J Invest Dermatol *105*, 147-152.

Kowalczyk, A. P., Bornslaeger, E. A., Borgwardt, J. E., Palka, H. L., Dhaliwal, A. S., Corcoran, C. M., Denning, M. F., and Green, K. J. (1997). The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. J Cell Biol *139*, 773-784.

Kowalewski, C., Mackiewicz, W., Schmitt, D., Jablonska, S., and Haftek, M. (2001). Cell-cell junctions in acantholytic diseases. Junction proteins in nonimmune and autoimmune acantholysis. Arch Dermatol Res *293*, 1-11.

Kralovicova, J., Gaunt, T. R., Rodriguez, S., Wood, P. J., Day, I. N., and Vorechovsky, I. (2006). Variants in the human insulin gene that affect pre-mRNA splicing: is -23HphI a functional single nucleotide polymorphism at IDDM2? Diabetes *55*, 260-264.

Kricheli, D., David, M., Frusic-Zlotkin, M., Goldsmith, D., Rabinov, M., Sulkes, J., and Milner, Y. (2000). The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. Br J Dermatol *143*, 337-342.

Ku, G., Kronenberg, M., Peacock, D. J., Tempst, P., Banquerigo, M. L., Braun, B. S., Reeve, J. R., Jr., and Brahn, E. (1993). Prevention of experimental autoimmune arthritis with a peptide fragment of type II collagen. Eur J Immunol *23*, 591-599.

-L-

Lampasona, V., Bearzatto, M., Genovese, S., Bosi, E., Ferrari, M., and Bonifacio, E. (1996). Autoantibodies in insulin-dependent diabetes

recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. J Immunol *157*, 2707-2711.

Lanza, A., Femiano, F., De Rosa, A., Cammarota, M., Lanza, M., and Cirillo, N. (2006). The N-terminal fraction of desmoglein 3 encompassing its immunodominant domain is present in human serum: implications for pemphigus vulgaris autoimmunity. Int J Immunopathol Pharmacol *19*, 399-407.

Larger, E., Becourt, C., Bach, J. F., and Boitard, C. (1995). Pancreatic islet beta cells drive T cell-immune responses in the nonobese diabetic mouse model. J Exp Med *181*, 1635-1642.

Lehmann, P. V., Sercarz, E. E., Forsthuber, T., Dayan, C. M., and Gammon, G. (1993). Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. Immunol Today *14*, 203-208.

Leung, C. L., Green, K. J., and Liem, R. K. (2002). Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. Trends Cell Biol *12*, 37-45.

Leung, C. L., Zheng, M., Prater, S. M., and Liem, R. K. (2001). The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. J Cell Biol *154*, 691-697.

Lever, W. F. (1953). Pemphigus. Medicine (Baltimore) *32*, 1-123.

Li, H. S., and Carayanniotis, G. (2005). Detection of thyroglobulin mRNA as truncated isoform(s) in mouse thymus. Immunology *115*, 85-89.

Li, N., Aoki, V., Hans-Filho, G., Rivitti, E. A., and Diaz, L. A. (2003). The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Exp Med *197*, 1501-1510.

Liblau, R., Tournier-Lasserve, E., and Hauw, J. J. (1992) *Encéphalomyélite allergique expérimentale* (Charpin, J., Vervloet, D. eds). Flammarion Méd-Sci, Ser Allergologie, Paris.

Lin, M. S., Fu, C. L., Aoki, V., Hans-Filho, G., Rivitti, E. A., Moraes, J. R., Moraes, M. E., Lazaro, A. M., Giudice, G. J., Stastny, P., and Diaz, L. A. (2000). Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Clin Invest *105*, 207-213.

Lin, M. S., Swartz, S. J., Lopez, A., Ding, X., Fernandez-Vina, M. A., Stastny, P., Fairley, J. A., and Diaz, L. A. (1997). Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. J Clin Invest *99*, 31-40.

Liu, Z., Giudice, G. J., Swartz, S. J., Fairley, J. A., Till, G. O., Troy, J. L., and Diaz, L. A. (1995). The role of complement in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest *95*, 1539-1544.

Loiseau, P., Lecleach, L., Prost, C., Lepage, V., Busson, M., Bastuji-Garin, S., Roujeau, J. C., and Charron, D. (2000). HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. J Autoimmun *15*, 67-73.

Lombardi, M. L., Mercuro, O., Ruocco, V., Lo Schiavo, A., Lombari, V., Guerrera, V., Pirozzi, G., and Manzo, C. (1999). Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. J Invest Dermatol *113*, 107-110.

Lombardi, M. L., Mercuro, O., Tecame, G., Fusco, C., Ruocco, V., Salerno, A., Pirozzi, G., and Manzo, C. (1996). Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens *47*, 228-230.

Lucassen, A. M., Screaton, G. R., Julier, C., Elliott, T. J., Lathrop, M., and Bell, J. I. (1995). Regulation of insulin gene expression by the IDDM associated, insulin locus haplotype. Hum Mol Genet *4*, 501-506.

Lukac, J., Brozovic, S., Vucicevic-Boras, V., Mravak-Stipetic, M., Malenica, B., and Kusic, Z. (2006). Serum autoantibodies to desmogleins 1 and 3 in patients with oral lichen planus. Croat Med J *47*, 53-58.

Lynch, K. W., and Weiss, A. (2001). A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. J Biol Chem *276*, 24341-24347.

-M-

Maatta, A., DiColandrea, T., Groot, K., and Watt, F. M. (2001). Gene targeting of envoplakin, a cytoskeletal linker protein and precursor of the epidermal cornified envelope. Mol Cell Biol *21*, 7047-7053.

Madaio, M. P. (2000). Major peptide autoepitopes for nucleosome-specific T cells of human lupus. Am J Kidney Dis *35*, 992-996.

Mahoney, M. G., Aho, S., Uitto, J., and Stanley, J. R. (1998). The members of the plakin family of proteins recognized by paraneoplastic pemphigus antibodies include periplakin. J Invest Dermatol *111*, 308-313.

Mahoney, M. G., Hu, Y., Brennan, D., Bazzi, H., Christiano, A. M., and Wahl, J. K., 3rd (2006). Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. Exp Dermatol *15*, 101-109.

Mahoney, M. G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P. J., Amagai, M., and Stanley, J. R. (1999a). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J Clin Invest *103*, 461-468.

Mahoney, M. G., Wang, Z. H., and Stanley, J. R. (1999b). Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. J Invest Dermatol *113*, 22-25.

Mamula, M. J. (1998). Epitope spreading: the role of self peptides and autoantigen processing by B lymphocytes. Immunol Rev *164*, 231-239.

Marcozzi, C., Burdett, I. D., Buxton, R. S., and Magee, A. I. (1998). Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. J Cell Sci *111 (Pt 4)*, 495-509.

Marcucci, G., Caligiuri, M. A., Dohner, H., Archer, K. J., Schlenk, R. F., Dohner, K., Maghraby, E. A., and Bloomfield, C. D. (2001). Quantification of CBFbeta/MYH11 fusion transcript by real time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. Leukemia *15*, 1072-1080.

Markovic-Plese, S., Fukaura, H., Zhang, J., al-Sabbagh, A., Southwood, S., Sette, A., Kuchroo, V. K., and Hafler, D. A. (1995). T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. J Immunol *155*, 982-992.

Martel, P., Gilbert, D., Busson, M., Loiseau, P., Lepage, V., Drouot, L., Delaporte, E., Prost, C., Joly, P., Charron, D., and Tron, F. (2002). Epistasis between DSG1 and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. Genes Immun *3*, 205-210.

Martel, P., and Joly, P. (2001a). [Paraneoplastic pemphigus]. Ann Dermatol Venereol *128*, 1256-1259.

Martel, P., Gilbert, D., Drouot, L., Prost, C., Raux, G., Delaporte, E., Joly, P., and Tron, F. (2001b). A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. Genes Immun *2*, 41-43.

Martel, P., Gilbert, D., Labeille, B., Kanitakis, J., and Joly, P. (2000). A case of paraneoplastic pemphigus with antidesmoglein 1 antibodies as determined by immunoblotting. Br J Dermatol *142*, 812-813.

Martel, P., Loiseau, P., Joly, P., Busson, M., Lepage, V., Mouquet, H., Courville, P., Flageul, B., Charron, D., Musette, P., *et al.* (2003). Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1*03 allele. J Autoimmun *20*, 91-95.

Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C., and Green, D. R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J Biol Chem *270*, 6425-6428.

Marzano, A. V., Grammatica, A., Cozzani, E., Terracina, M., and Berti, E. (2001). Paraneoplastic pemphigus. A report of two cases associated with chronic B-cell lymphocytic leukaemia. Br J Dermatol *145*, 127-131.

Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. Science *286*, 1732-1735.

Matsuo, K., Komai, A., Ishii, K., Futei, Y., Amagai, M., Deguchi, H., Danno, K., and Hashimoto, T. (2001). Pemphigus foliaceus with prominent neutrophilic pustules. Br J Dermatol *145*, 132-136.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. Science *296*, 301-305.

McGargill, M. A., Derbinski, J. M., and Hogquist, K. A. (2000). Receptor editing in developing T cells. Nat Immunol *1*, 336-341.

Mevorach, D., Zhou, J. L., Song, X., and Elkon, K. B. (1998). Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. J Exp Med *188*, 387-392.

Milner, Y., Metezeau, P., Kiefer, H., Finemesser, M., Bregegere, F., Zlotkin, M., Wang, X., Michel, B : Pemphigus an autoimmune disease of the skin: cell-cell separation versus membrane signaling and apoptosis in acantholysis. Shoenfeld Y eds. The Decade of Autoimmunity. 1999:pp 606-615 Elsevier Science BV, Amsterdam

Miyagawa, S., Amagai, M., Iida, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, T., and Shirai, T. (1999a). Late development of antidesmoglein 1 antibodies in pemphigus vulgaris: correlation with disease progression. Br J Dermatol *141*, 1084-1087.

Miyagawa, S., Amagai, M., Niizeki, H., Yamashina, Y., Kaneshige, T., Nishikawa, T., Shirai, T., and Inoko, H. (1999b). HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. Tissue Antigens *54*, 333-340.

Mocci, S., Lafferty, K., and Howard, M. (2000). The role of autoantigens in autoimmune disease. Curr Opin Immunol *12*, 725-730.

Modrek, B., and Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. Nat Genet *30*, 13-19.

Moesta, A. K., Lin, M. S., Diaz, L. A., and Sinha, A. A. (2002). T cell receptor Beta chain gene usage in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Invest Dermatol *119*, 377-383.

Mohimen, A., Narula, M., Ruocco, V., Pisani, M., and Ahmed, A. R. (1993). Presence of the autoantibody in healthy relatives of Italian patients with pemphigus vulgaris. Arch Dermatol Res *285*, 176-177.

Montagutelli, X., Lalouette, A., Boulouis, H. J., Guenet, J. L., and Sundberg, J. P. (1997). Vesicle formation and follicular root sheath separation in mice homozygous for deleterious alleles at the balding (bal) locus. J Invest Dermatol *109*, 324-328.

Moraes, M. E., Fernandez-Vina, M., Lazaro, A., Diaz, L. A., Filho, G. H., Friedman, H., Rivitti, E., Aoki, V., Stastny, P., and Moraes, J. R. (1997). An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. Tissue Antigens *49*, 35-40.

Morel, L., Blenman, K. R., Croker, B. P., and Wakeland, E. K. (2001). The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 1787-1792.

Morel, L., Croker, B. P., Blenman, K. R., Mohan, C., Huang, G., Gilkeson, G., and Wakeland, E. K. (2000). Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 6670-6675.

Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (2005). Understanding crypticity is the key to revealing the pathogenesis of autoimmunity. Trends Immunol *26*, 355-359.

Mouquet, H., and Tron, F. Alternative spliced autoantigens: Implications in autoimmune diseases. (In preparation).

Mouquet, H., Berrih-Aknin, S., Joly, P., Tron, F., and Gilbert, D. Transcript of desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is expressed in human thymus. (In preparation).

Mouquet, H., Farci, S., Joly, P., Drouot, L., Leblond, J., Leprince, J., Tonon, M. C., Loiseau, P., Charron, D., Maillère, B., Tron, F., and Gilbert, D. 2006. A truncated alternative spliced isoform of human desmoglein 1 contains a specific T-cell epitope binding to the pemphigus foliaceus-associated HLA class II DRβ1*0102 molecule. J Immunol *177*, 6517-6526.

Mouquet, H., Drouot, L., Charlionnet, R., Arnoult, C., Bonnet-Bayeux, F., Thomas, M., Leprince, J., Joly, P., Tron, F., and Gilbert, D. (2006). Proteomic analysis of the autoantibody response following immunization with a single autoantigen. Proteomics *6*, 4829-4837.

Mouquet, H., Gilbert, D., Musette, P., Tron, F., and Joly, P. (2005). [Molecular advances in pathogenesis of autoimmune blistering skin diseases]. Ann Dermatol Venereol *132*, 231-242.

Mukhtar, E. D., Smith, B. R., Pyle, G. A., Hall, R., and Vice, P. (1975). Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins to thyroid function and effects of surgery, radioiodine, and antithyroid drugs. Lancet *1*, 713-715.

Muller, R., Svoboda, V., Wenzel, E., Gebert, S., Hunzelmann, N., Muller, H. H., and Hertl, M. (2006). IgG reactivity against non-conformational NH-terminal epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris. Exp Dermatol *15*, 606-614.

Murakami, M., Hosoi, Y., Negishi, T., Kamiya, Y., Miyashita, K., Yamada, M., Iriuchijima, T., Yokoo, H., Yoshida, I., Tsushima, Y., and Mori, M. (1996). Thymic hyperplasia in patients with Graves' disease. Identification of thyrotropin receptors in human thymus. J Clin Invest *98*, 2228-2234.

Musette, P., Mouquet, H., Jacquot, S., Dutot, I., Gilbert, D., Gougeon, M. L., Roujeau, J. C., D'Incan, M., Bedane, C., Tron, F., Hertl, M., and Joly, P. Effects of anti-CD20 immunotherapy on humoral and cellular immune responses in pemphigus. (In preparation).

Mutasim, D. F., Pelc, N. J., and Anhalt, G. J. (1993a). Drug-induced pemphigus. Dermatol Clin *11*, 463-471.

Mutasim, D. F., Pelc, N. J., and Anhalt, G. J. (1993b). Paraneoplastic pemphigus. Dermatol Clin *11*, 473-481.

-N-

Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K. J., Lalioti, M. D., Mullis, P. E., Antonarakis, S. E., *et al.* (1997). Positional cloning of the APECED gene. Nat Genet *17*, 393-398.

Nagasaka, T., Nishifuji, K., Ota, T., Whittock, N. V., and Amagai, M. (2004). Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. J Clin Invest *114*, 1484-1492.

Nagata, Y., Karashima, T., Watt, F. M., Salmhofer, W., Kanzaki, T., and Hashimoto, T. (2001). Paraneoplastic pemphigus sera react strongly with multiple epitopes on the various regions of envoplakin and periplakin, except for the c-terminal homologous domain of periplakin. J Invest Dermatol *116*, 556-563.

Nakahama, M., Mohri, N., Mori, S., Shindo, G., Yokoi, Y., and Machinami, R. (1990). Immunohistochemical and histometrical studies of the human thymus with special emphasis on age-related changes in medullary epithelial and dendritic cells. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol *58*, 245-251.

Nakken, B., Jonsson, R., and Bolstad, A. I. (2001). Polymorphisms of the Ro52 gene associated with anti-Ro 52-kd autoantibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum *44*, 638-646.

Naserke, H. E., Ziegler, A. G., Lampasona, V., and Bonifacio, E. (1998). Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. J Immunol *161*, 6963-6969.

Nave, K. A., Lai, C., Bloom, F. E., and Milner, R. J. (1987). Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 5665-5669.

Nemazee, D., and Hogquist, K. A. (2003). Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. Curr Opin Immunol *15*, 182-189.

Ng, B., Yang, F., Huston, D. P., Yan, Y., Yang, Y., Xiong, Z., Peterson, L. E., Wang, H., and Yang, X. F. (2004). Increased noncanonical splicing of autoantigen transcripts provides the structural basis for expression of untolerized epitopes. J Allergy Clin Immunol *114*, 1463-1470.

Nguyen, V. T., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Kitajima, Y., Pittelkow, M., and Grando, S. A. (2004). Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. J Biol Chem *279*, 2135-2146.

Nguyen, V. T., Ndoye, A., Shultz, L. D., Pittelkow, M. R., and Grando, S. A. (2000a). Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. J Clin Invest *106*, 1467-1479.

Nguyen, V. T., Ndoye, A., and Grando, S. A. (2000b). Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. J Biol Chem *275*, 29466-29476.

Nguyen, V. T., Ndoye, A., and Grando, S. A. (2000c). Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. Am J Pathol *157*, 1377-1391.

Niizeki, H., Kumagai, S., Kanagawa, S., Amagai, M., Yamashina, Y., Asada, H., Nishikawa, T., and Miyagawa, S. (2004). Exclusion of the TAP1 and TAP2 genes within the HLA class II region as candidate susceptibility genes to pemphigus in the Japanese population. J Dermatol Sci *36*, 122-124.

Nilles, L. A., Parry, D. A., Powers, E. E., Angst, B. D., Wagner, R. M., and Green, K. J. (1991). Structural analysis and expression of human desmoglein: a cadherin-like component of the desmosome. J Cell Sci *99 (Pt 4)*, 809-821.

Nishifuji, K., Amagai, M., Kuwana, M., Iwasaki, T., and Nishikawa, T. (2000). Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production. J Invest Dermatol *114*, 88-94.

Nishimura, H., and Strominger, J. L. (2006). Involvement of a tissue-specific autoantibody in skin disorders of murine systemic lupus erythematosus and autoinflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 3292-3297.

Nousari, H. C., Deterding, R., Wojtczack, H., Aho, S., Uitto, J., Hashimoto, T., and Anhalt, G. J. (1999). The mechanism of respiratory failure in paraneoplastic pemphigus. N Engl J Med *340*, 1406-1410.

Nousari, H. C., Moresi, M., Klapper, M., and Anhalt, G. J. (2001). Nonendemic pemphigus foliaceus presenting as fatal bullous exfoliative erythroderma. Cutis *67*, 251-252.

Nuber, U. A., Schafer, S., Schmidt, A., Koch, P. J., and Franke, W. W. (1995). The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. Eur J Cell Biol *66*, 69-74.

-O-

Ohata, Y., Amagai, M., Ishii, K., and Hashimoto, T. (2001). Immunoreactivity against intracellular domains of desmogleins in pemphigus. J Dermatol Sci *25*, 64-71.

Ohyama, M., Amagai, M., Hashimoto, T., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., and Nishikawa, T. (2001). Clinical phenotype and anti-desmoglein autoantibody profile in paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol *44*, 593-598.

Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A., and Nishikawa, T. (2002). Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol *118*, 199-204.

Oksenberg, J. R., Panzara, M. A., Begovich, A. B., Mitchell, D., Erlich, H. A., Murray, R. S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C. C., and et al. (1993). Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. Nature *362*, 68-70.

Ortiz-Urda, S., Elbe-Burger, A., Smolle, J., Marquart, Y., Chudnovsky, Y., Ridky, T. W., Bernstein, P., Wolff, K., and Rappersberger, K. (2003). The plant lectin wheat germ agglutinin inhibits the binding of pemphigus foliaceus autoantibodies to desmoglein 1 in a majority of patients and prevents pathomechanisms of pemphigus foliaceus in vitro and in vivo. J Immunol *171*, 6244-6250.

Osada, K., Seishima, M., and Kitajima, Y. (1997). Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. J Invest Dermatol *108*, 482-487.

Ota, M., Sato-Matsumura, K. C., Matsumura, T., Tsuji, Y., and Ohkawara, A. (2000). Pemphigus foliaceus and figurate erythema in a patient with prostate cancer. Br J Dermatol *142*, 816-818.

Ota, T., Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Simoda, K., Nishikawa, T., Amagai, M., and Koyasu, S. (2004). Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. Int Immunol *16*, 1487-1495.

Oursler, J. R., Labib, R. S., Ariss-Abdo, L., Burke, T., O'Keefe, E. J., and Anhalt, G. J. (1992). Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. J Clin Invest *89*, 1775-1782.

Ozawa, M., Terada, H., and Pedraza, C. (1995). The fourth armadillo repeat of plakoglobin (gamma-catenin) is required for its high affinity binding to the cytoplasmic domains of E-cadherin and desmosomal cadherin Dsg2, and the tumor suppressor APC protein. J Biochem (Tokyo) *118*, 1077-1082.

-P-

Park, Y. S., Kawasaki, E., Kelemen, K., Yu, L., Schiller, M. R., Rewers, M., Mizuta, M., Eisenbarth, G. S., and Hutton, J. C. (2000). Humoral autoreactivity to an alternatively spliced variant of ICA512/IA-2 in Type I diabetes. Diabetologia *43*, 1293-1301.

Pavoni, D. P., Roxo, V. M., Marquart Filho, A., and Petzl-Erler, M. L. (2003). Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. Genes Immun *4*, 110-116.

Pavoni, D. P., Cerqueira, L. B., Roxo, V. M. M. S., and Petz-Erler, M. L. (2006). Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). Braz J Med Biol Res *39*, 1227-1232.

Payne, A. S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J. R., and Siegel, D. L. (2005). Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. J Clin Invest *115*, 888-899.

Pelacho, B., Natal, C., Espana, A., Sanchez-Carpintero, I., Iraburu, M. J., and Lopez-Zabalza, M. J. (2004). Pemphigus vulgaris autoantibodies induce apoptosis in HaCaT keratinocytes. FEBS Lett *566*, 6-10.

Pereira, N. F., Hansen, J. A., Lin, M. T., Roxo, V. M., Braun, K., and Petzl-Erler, M. L. (2004). Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. Cytokine *28*, 233-241.

Peterson, P., and Peltonen, L. (2005). Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. J Autoimmun *25 Suppl*, 49-55.

Petzl-Erler, M. L., and Malheiros, D. (2005). Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? J Autoimmun *25*, 121-125.

Pisitkun, P., Deane, J. A., Difilippantonio, M. J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A. B., and Bolland, S. (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. Science *312*, 1669-1672.

Prisco, A., Troncone, R., Mazzarella, G., Gianfrani, C., Auricchio, S., Even, J., Tiberio, C., Guardiola, J., and De Berardinis, P. (1997). Identical T-cell receptor beta chain rearrangements are present in T cells infiltrating the jejunal mucosa of untreated celiac patients. Hum Immunol *55*, 22-33.

Proby, C. M., Ota, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Gamou, S., Shimizu, N., Wahl, J. K., Wheelock, M. J., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2000). Development of chimeric molecules for recognition and targeting of antigen-specific B cells in pemphigus vulgaris. Br J Dermatol *142*, 321-330.

Puttagunta, S., Mathur, M., and Cowin, P. (1994). Structure of DSG1, the bovine desmosomal cadherin gene encoding the pemphigus foliaceus antigen. Evidence of polymorphism. J Biol Chem *269*, 1949-1955.

Puviani, M., Marconi, A., Cozzani, E., and Pincelli, C. (2003). Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. J Invest Dermatol *120*, 164-167.

Pytela, R., and Wiche, G. (1980). High molecular weight polypeptides (270,000-340,000) from cultured cells are related to hog brain microtubule-associated proteins but copurify with intermediate filaments. Proc Natl Acad Sci U S A *77*, 4808-4812.

-R-

Raaijmakers, M. H., van Emst, L., de Witte, T., Mensink, E., and Raymakers, R. A. (2002). Quantitative assessment of gene expression in highly purified hematopoietic cells using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. Exp Hematol *30*, 481-487.

Rabilloud, T., and Chevallet, M. in: Rabilloud, T. (Ed.), *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Ide tification Methods*, Springer-Verlag, Berlin 2000, pp. 9-29.

Radic, M. Z., and Weigert, M. (1994). Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. Annu Rev Immunol *12*, 487-520.

Rappersberger, K., Roos, N., and Stanley, J. R. (1992). Immunomorphologic and biochemical identification of the pemphigus foliaceous autoantigen within desmosomes. J Invest Dermatol *99*, 323-330.

Reis, V. M., Toledo, R. P., Lopez, A., Diaz, L. A., and Martins, J. E. (2000). UVB-induced acantholysis in endemic Pemphigus foliaceus (Fogo selvagem) and Pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol *42*, 571-576.

Revenga-Arranz, F., Martinez-Lasso, J., and Vanaclocha-Sebastian, F. (1996). Pemphigus vulgaris in two MHC-haploidentical brothers. Dermatology *193*, 71-72.

Risch, N. (1987). Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. Am J Hum Genet *40*, 1-14.

Rogers, S. W., Twyman, R. E., and Gahring, L. C. (1996). The role of autoimmunity to glutamate receptors in neurological disease. Mol Med Today *2*, 76-81.

Rosatelli, T. B., Roselino, A. M., Dellalibera-Joviliano, R., Reis, M. L., and Donadi, E. A. (2005). Increased activity of plasma and tissue kallikreins, plasma kininase II and salivary kallikrein in pemphigus foliaceus (fogo selvagem). Br J Dermatol *152*, 650-657.

Roscoe, J. T., Diaz, L., Sampaio, S. A., Castro, R. M., Labib, R. S., Takahashi, Y., Patel, H., and Anhalt, G. J. (1985). Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. J Invest Dermatol *85*, 538-541.

Rose, N. R., and Bona, C. (1993). Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). Immunol Today *14*, 426-430.

Roth, H. J., Kronquist, K. E., Kerlero de Rosbo, N., Crandall, B. F., and Campagnoni, A. T. (1987). Evidence for the expression of four myelin basic protein variants in the developing human spinal cord through cDNA cloning. J Neurosci Res *17*, 321-328.

Roxo, V. M., Pereira, N. F., Pavoni, D. P., Lin, M. T., Hansen, J. A., de, O. P. C., Filho, A. M., and Petzl-Erler, M. L. (2003). Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus--are there any associations? Tissue Antigens *62*, 394-400.

Ruhrberg, C., Hajibagheri, M. A., Parry, D. A., and Watt, F. M. (1997). Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. J Cell Biol *139*, 1835-1849.

Ruhrberg, C., Hajibagheri, M. A., Simon, M., Dooley, T. P., and Watt, F. M. (1996). Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. J Cell Biol *134*, 715-729.

Ruocco, V., Brenner, S., and Ruocco, E. (2001). Pemphigus and diet: does a link exist? Int J Dermatol *40*, 161-163.

Ruocco, V., De Angelis, E., and Lombardi, M. L. (1993). Drug-induced pemphigus. II. Pathomechanisms and experimental investigations. Clin Dermatol *11*, 507-513.

-S-

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol *22*, 531-562.

Salato, V. K., Hacker-Foegen, M. K., Lazarova, Z., Fairley, J. A., and Lin, M. S. (2005). Role of intramolecular epitope spreading in pemphigus vulgaris. Clin Immunol *116*, 54-64.

Sami, N., Bhol, K. C., Beutner, E. H., Plunkett, R. W., Leiferman, K. M., Foster, C. S., and Ahmed, A. R. (2001a). Simultaneous presence of mucous membrane pemphigoid and pemphigus vulgaris: molecular characterization of both autoantibodies. Clin Immunol *100*, 219-227.

Sami, N., and Ahmed, A. R. (2001b). Penile pemphigus. Arch Dermatol *137*, 756-758.

Sampaio, S. A., Rivitti, E. A., Aoki, V., and Diaz, L. A. (1994). Brazilian pemphigus foliaceus, endemic pemphigus foliaceus, or fogo selvagem (wild fire). Dermatol Clin *12*, 765-776.

Sanchez-Carpintero, I., Espana, A., Pelacho, B., Lopez Moratalla, N., Rubenstein, D. S., Diaz, L. A., and Lopez-Zabalza, M. J. (2004). In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. Br J Dermatol *151*, 565-570.

Sanchez-Palacios, C., and Chan, L. S. (2004). Development of pemphigus herpetiformis in a patient with psoriasis receiving UV-light treatment. J Cutan Pathol *31*, 346-349.

Santi, C. G., and Sotto, M. N. (2001). Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Am Acad Dermatol *44*, 446-450.

Sato, M., Aoyama, Y., and Kitajima, Y. (2000). Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. Lab Invest *80*, 1583-1592.

Schaefer, B. M., Jaeger, C. J., and Kramer, M. D. (1996). Plasminogen activator system in pemphigus vulgaris. Br J Dermatol *135*, 726-732.

Schafer, S., Koch, P. J., and Franke, W. W. (1994). Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. Exp Cell Res *211*, 391-399.

Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B., and van Venrooij, W. J. (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest *101*, 273-281.

Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. Annu Rev Immunol *17*, 829-874.

Segal, B. M., Raine, C. S., McFarlin, D. E., Voskuhl, R. R., and McFarland, H. F. (1994). Experimental allergic encephalomyelitis induced by the peptide encoded by exon 2 of the MBP gene, a peptide implicated in remyelination. J Neuroimmunol *51*, 7-19.

Seishima, M., Esaki, C., Osada, K., Mori, S., Hashimoto, T., and Kitajima, Y. (1995). Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. J Invest Dermatol *104*, 33-37.

Seishima, M., Satoh, S., Nojiri, M., Osada, K., and Kitajima, Y. (1997). Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes. J Invest Dermatol *109*, 650-655.

Sekiguchi, M., Futei, Y., Fujii, Y., Iwasaki, T., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2001). Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. J Immunol *167*, 5439-5448.

Sempowski, G.D., Hale, L. P., Sundy, J. S., Massey, J. M., Koup, R. A., Douek, D. C., Patel, D. D., and Haynes, B. F. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. J Immunol *164*, 2180-2187.

Serpente, N., Marcozzi, C., Roberts, G. A., Bao, Q., Angst, B. D., Hirst, E. M., Burdett, I. D., Buxton, R. S., and Magee, A. I. (2000). Extracellularly truncated desmoglein 1 compromises desmosomes in MDCK cells. Mol Membr Biol *17*, 175-183.

Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R., and Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. Nature *374*, 327-337.

Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Saito, H., Oka, H., Tsunoda, K., Amagai, M., and Nishikawa, T. (2005). In vivo ultrastructural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosome mid-line. J Invest Dermatol *124*, 984-989.

Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Tsunoda, K., Amagai, M., and Nishikawa, T. (2004). IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. J Invest Dermatol *122*, 1145-1153.

Shirakata, Y., Amagai, M., Hanakawa, Y., Nishikawa, T., and Hashimoto, K. (1998). Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. J Invest Dermatol *110*, 76-78.

Shlomchik, M., Mascelli, M., Shan, H., Radic, M. Z., Pisetsky, D., Marshak-Rothstein, A., and Weigert, M. (1990). Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. J Exp Med *171*, 265-292.

Shlomchik, M. J., Aucoin, A. H., Pisetsky, D. S., and Weigert, M. G. (1987). Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 9150-9154.

Silos, S. A., Tamai, K., Li, K., Kivirikko, S., Kouba, D., Christiano, A. M., and Uitto, J. (1996). Cloning of the gene for human pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3), a desmosomal cadherin. Characterization of the promoter region and identification of a keratinocyte-specific cis-element. J Biol Chem *271*, 17504-17511.

Simon, D. G., Krutchkoff, D., Kaslow, R. A., and Zarbo, R. (1980). Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972 to 1977. Arch Dermatol *116*, 1035-1037.

Singal, D. P., and Blajchman, M. A. (1973). Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. Diabetes *22*, 429-432.

Skerrow, C. J., and Matoltsy, A. G. (1974). Chemical characterization of isolated epidermal desmosomes. J Cell Biol *63*, 524-530.

Slomov, E., Loewenthal, R., Goldberg, I., Korostishevsky, M., Brenner, S., and Gazit, E. (2003). Pemphigus vulgaris in Jewish patients is associated with HLA-A region genes: mapping by microsatellite markers. Hum Immunol *64*, 771-779.

Smith, E. A., and Fuchs, E. (1998). Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. J Cell Biol *141*, 1229-1241.

Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Dominguez, O., Juan, M., Foz-Sala, M., and Pujol-Borrell, R. (1998). Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. J Immunol *161*, 5918-5929.

South, A. P., Wan, H., Stone, M. G., Dopping-Hepenstal, P. J., Purkis, P. E., Marshall, J. F., Leigh, I. M., Eady, R. A., Hart, I. R., and McGrath, J. A. (2003). Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. J Cell Sci *116*, 3303-3314.

Stafford, E. A., and Rose, N. R. (2000). Newer insights into the pathogenesis of experimental autoimmune thyroiditis. Int Rev Immunol *19*, 501-533.

Stamm, S. (2002). Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. Hum Mol Genet *11*, 2409-2416.

Stanley, J. R. (2000). Understanding of the pathophysiology of pemphigus suggests innovative therapeutic approaches. Br J Dermatol *142*, 208-209.

Stanley, J. R., Hawley-Nelson, P., Yuspa, S. H., Shevach, E. M., and Katz, S. I. (1981). Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. Cell *24*, 897-903.

Stanley, J. R., Klaus-Kovtun, V., and Sampaio, S. A. (1986a). Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. J Invest Dermatol *87*, 197-201.

Stanley, J. R., Koulu, L., Klaus-Kovtun, V., and Steinberg, M. S. (1986b). A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein I binds the same polypeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. J Immunol *136*, 1227-1230.

Stanley, J. R., Koulu, L., and Thivolet, C. (1984). Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. J Clin Invest *74*, 313-320.

Stanley, J. R., Yaar, M., Hawley-Nelson, P., and Katz, S. I. (1982). Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. J Clin Invest *70*, 281-288.

Stulik, J., Hernychova, L., Porkertova, S., Pozler, O., Tuckova, L., Sanchez, D., and Bures, J. (2003). Identification of new celiac disease autoantigens using proteomic analysis. Proteomics *3*, 951-956.

Summers, M. D., and Smith, G. E. *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555. Texas Agricultural Experimental Station, College Station 1987.

-T-

Takahashi, H., Amagai, M., Tanikawa, A., Suzuki, S., Ikeda, Y., Nishikawa, T., Kawakami, Y., and Kuwana, M. (2006). T Helper Type 2-Biased Natural Killer Cell Phenotype in Patients with Pemphigus Vulgaris. J Invest Dermatol.

Takeda, Y., Caudell, P., Grady, G., Wang, G., Suwa, A., Sharp, G. C., Dynan, W. S., and Hardin, J. A. (1999). Human RNA helicase A is a lupus autoantigen that is cleaved during apoptosis. J Immunol *163*, 6269-6274.

Tanaka, M., Kishimura, M., Ozaki, S., Osakada, F., Hashimoto, H., Okubo, M., Murakami, M., and Nakao, K. (2000). Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. J Clin Invest *106*, 137-144.

Taub, D. D., and Longo, D. L. (2005). Insights into thymic aging and regeneration. Immunol Rev *205*, 72-93.

Texier, C., Pouvelle-Moratille, S., Busson, M., Charron, D., Menez, A., and Maillere, B. (2001). Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. Eur J Immunol *31*, 1837-1846.

Texier, C., Pouvelle, S., Busson, M., Herve, M., Charron, D., Menez, A., and Maillere, B. (2000). HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. J Immunol *164*, 3177-3184.

The Finnish-German APECED Consortium. (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. The Finnish-German APECED Consortium. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. Nat Genet *17*, 399-403.

Thebault-Baumont, K., Dubois-Laforgue, D., Krief, P., Briand, J. P., Halbout, P., Vallon-Geoffroy, K., Morin, J., Laloux, V., Lehuen, A., Carel, J. C., *et al*. (2003). Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. J Clin Invest *111*, 851-857.

Thebault, S., Gilbert, D., Hubert, M., Drouot, L., Machour, N., Lange, C., Charlionet, R., and Tron, F. (2002). Orderly pattern of development of the autoantibody response in (New Zealand White x BXSB)F1 lupus mice: characterization of target antigens and antigen spreading by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. J Immunol *169*, 4046-4053.

Thomson, G., Robinson, W. P., Kuhner, M. K., Joe, S., MacDonald, M. J., Gottschall, J. L., Barbosa, J., Rich, S. S., Bertrams, J., Baur, M. P., and et al. (1988). Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Hum Genet *43*, 799-816.

Tilkin, A. F., Lubin, R., Soussi, T., Lazar, V., Janin, N., Mathieu, M. C., Lefrere, I., Carlu, C., Roy, M., Kayibanda, M., and et al. (1995). Primary proliferative T cell response to wild-type p53 protein in patients with breast cancer. Eur J Immunol *25*, 1765-1769.

Tisch, R., and McDevitt, H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. Cell *85*, 291-297.

Torzecka, J. D., Narbutt, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Borowiec, M., Ptasinska, A., Woszczek, G., and Kowalski, M. L. (2003). Tumour necrosis factor-alpha polymorphism as one of the complex inherited factors in pemphigus. Mediators Inflamm *12*, 303-307.

Tremeau-Martinage, C., Oksman, F., and Bazex, J. (1995). [Immunoglobulin G subclass distribution of anti-intercellular substance antibodies in pemphigus]. Ann Dermatol Venereol *122*, 409-411.

Tron, F., Gilbert, D., Mouquet, H., Joly, P., Drouot, L., Makni, S., Masmoudi, H., Charron, D., Zitouni, M., Loiseau, P., and Ben Ayed, M. (2005). Genetic factors in pemphigus. J Autoimmun *24*, 319-328.

Troster, H., Metzger, T. E., Semsei, I., Schwemmle, M., Winterpacht, A., Zabel, B., and Bachmann, M. (1994). One gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjogrens' syndrome. J Exp Med *180*, 2059-2067.

Trotter, J. L., Pelfrey, C. M., Trotter, A. L., Selvidge, J. A., Gushleff, K. C., Mohanakumar, T., and McFarland, H. F. (1998). T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and control subjects. J Neuroimmunol *84*, 172-178.

Troyanovsky, S. (2005). Cadherin dimers in cell-cell adhesion. Eur J Cell Biol *84*, 225-233.

Tselepis, C., Chidgey, M., North, A., and Garrod, D. (1998). Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 8064-8069.

Tseng, C. E., Chan, E. K., Miranda, E., Gross, M., Di Donato, F., and Buyon, J. P. (1997). The 52-kd protein as a target of intermolecular spreading of the immune response to components of the SS-A/Ro-SS-B/La complex. Arthritis Rheum *40*, 936-944.

Tsukada, Y., Ichikawa, H., Chai, Z., Lai, F. P., Dunster, K., Sentry, J. W., and Toh, B. H. (2000). Novel variant of p230 trans-Golgi network protein identified by serum from Sjogren's syndrome patient. Eur J Cell Biol *79*, 790-794.

Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2003). Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J Immunol *170*, 2170-2178.

Tsunoda, K., Ota, T., Suzuki, H., Ohyama, M., Nagai, T., Nishikawa, T., Amagai, M., and Koyasu, S. (2002). Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. Eur J Immunol *32*, 627-633.

Turley, S. J. (2002). Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. Curr Opin Immunol *14*, 765-770.

-U-

Udey, M. C., and Stanley, J. R. (1999). Pemphigus--diseases of antidesmosomal autoimmunity. Jama *282*, 572-576.

Utz, P. J., Hottelet, M., Schur, P. H., and Anderson, P. (1997). Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. J Exp Med *185*, 843-854.

Utz, P. J., Hottelet, M., van Venrooij, W. J., and Anderson, P. (1998). Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death. J Exp Med *187*, 547-560.

-V-

Vandenbroucke, II, Vandesompele, J., Paepe, A. D., and Messiaen, L. (2001). Quantification of splice variants using real-time PCR. Nucleic Acids Res *29*, E68-68.

Vanderlugt, C. J., and Miller, S. D. (1996). Epitope spreading. Curr Opin Immunol *8*, 831-836.

Vanderlugt, C. L., and Miller, S. D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. Nat Rev Immunol *2*, 85-95.

Vasicek, D., Vasickova, K., Kaiser, P., Drozenova, R., Citek, J., and Hala, K. (2001). Analysis of genetic regulation of chicken spontaneous autoimmune thyroiditis, an animal model of human Hashimoto's thyroiditis. Immunogenetics *53*, 776-785.

Veldman, C., Hohne, A., Dieckmann, D., Schuler, G., and Hertl, M. (2004a). Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. J Immunol *172*, 6468-6475.

Veldman, C., Pahl, A., Beissert, S., Hansen, W., Buer, J., Dieckmann, D., Schuler, G., and Hertl, M. (2006). Inhibition of the transcription factor Foxp3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory T cells into Th2-like cells. J Immunol *176*, 3215-3222.

Veldman, C., Stauber, A., Wassmuth, R., Uter, W., Schuler, G., and Hertl, M. (2003). Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. J Immunol *170*, 635-642.

Veldman, C. M., Gebhard, K. L., Uter, W., Wassmuth, R., Grotzinger, J., Schultz, E., and Hertl, M. (2004b). T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. J Immunol *172*, 3883-3892.

Virata, M. L., Wagner, R. M., Parry, D. A., and Green, K. J. (1992). Molecular structure of the human desmoplakin I and II amino terminus. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 544-548.

Voskuhl, R. R., McFarlin, D. E., Stone, R., and McFarland, H. F. (1993a). T-lymphocyte recognition of a portion of myelin basic protein encoded by an exon expressed during myelination. J Neuroimmunol *42*, 187-191.

Voskuhl, R. R., McFarlin, D. E., Tranquill, L. R., Deibler, G., Stone, R., Maloni, H., and McFarland, H. F. (1993b). A novel candidate autoantigen in a multiplex family with multiple sclerosis: prevalence of T-lymphocytes specific for an MBP epitope unique to myelination. J Neuroimmunol *46*, 137-144.

Voskuhl, R. R., Robinson, E. D., Segal, B. M., Tranquill, L., Camphausen, K., Albert, P. S., Richert, J. R., and McFarland, H. F. (1994). HLA restriction and TCR usage of T lymphocytes specific for a novel candidate autoantigen, X2 MBP, in multiple sclerosis. J Immunol *153*, 4834-4844.

Vu, T. N., Lee, T. X., Ndoye, A., Shultz, L. D., Pittelkow, M. R., Dahl, M. V., Lynch, P. J., and Grando, S. A. (1998). The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Arch Dermatol *134*, 971-980.

-W-

Wakkach, A., Guyon, T., Bruand, C., Tzartos, S., Cohen-Kaminsky, S., and Berrih-Aknin, S. (1996). Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. J Immunol *157*, 3752-3760.

Wang, G. Q., Xu, H., Wang, Y. K., Gao, X. H., Zhao, Y., He, C., Inoue, N., and Chen, H. D. (2005). Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. J Am Acad Dermatol *52*, 460-467.

Wang, L., Bu, D., Yang, Y., Chen, X., and Zhu, X. (2004a). Castleman's tumours and production of autoantibody in paraneoplastic pemphigus. Lancet *363*, 525-531.

Wang, X., Bregegere, F., Frusic-Zlotkin, M., Feinmesser, M., Michel, B., and Milner, Y. (2004b). Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. Apoptosis *9*, 131-143.

Wang, X., Bregegere, F., Soroka, Y., Frusic-Zlotkin, M., and Milner, Y. (2004c). Replicative senescence enhances apoptosis induced by pemphigus autoimmune antibodies in human keratinocytes. FEBS Lett *567*, 281-286.

Warren, S. J., Arteaga, L. A., Rivitti, E. A., Aoki, V., Hans-Filho, G., Qaqish, B. F., Lin, M. S., Giudice, G. J., and Diaz, L. A. (2003). The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. J Invest Dermatol *120*, 104-108.

Warren, S. J., Lin, M. S., Giudice, G. J., Hoffmann, R. G., Hans-Filho, G., Aoki, V., Rivitti, E. A., Santos, V., and Diaz, L. A. (2000). The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. N Engl J Med *343*, 23-30.

Waschke, J., Bruggeman, P., Baumgartner, W., Zillikens, D., and Drenckhahn, D. (2005). Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. J Clin Invest *115*, 3157-3165.

Waterhouse, N., Kumar, S., Song, Q., Strike, P., Sparrow, L., Dreyfuss, G., Alnemri, E. S., Litwack, G., Lavin, M., and Watters, D. (1996). Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases in apoptosis. J Biol Chem *271*, 29335-29341.

Weiske, J., Schoneberg, T., Schroder, W., Hatzfeld, M., Tauber, R., and Huber, O. (2001). The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. J Biol Chem *276*, 41175-41181.

Wellmann, S., Taube, T., Paal, K., Graf, V. E. H., Geilen, W., Seifert, G., Eckert, C., Henze, G., and Seeger, K. (2001). Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. Clin Chem *47*, 654-660.

Weerkamp, F., de Haas, E. F., Naber, B. A., Comans-Bitter, W. M., Bogers, A. J., van Dongen, J. J., and Staal, F. J. (2005). Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. J Allergy Clin Immunol *115*, 834-840.

Wheeler, G. N., Parker, A. E., Thomas, C. L., Ataliotis, P., Poynter, D., Arnemann, J., Rutman, A. J., Pidsley, S. C., Watt, F. M., Rees, D. A., and et al. (1991). Desmosomal glycoprotein DGI, a component of intercellular desmosome junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 4796-4800.

Whittock, N. V. (2003a). Genomic sequence analysis of the mouse desmoglein cluster reveals evidence for six distinct genes:

characterization of mouse DSG4, DSG5, and DSG6. J Invest Dermatol *120*, 970-980.

Whittock, N. V., and Bower, C. (2003b). Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. J Invest Dermatol *120*, 523-530.

Whittock, N. V., Hunt, D. M., Rickman, L., Malhi, S., Vogazianou, A. P., Dawson, L. F., Eady, R. A., Buxton, R. S., and McGrath, J. A. (2000). Genomic organization and amplification of the human desmosomal cadherin genes DSC1 and DSC3, encoding desmocollin types 1 and 3. Biochem Biophys Res Commun *276*, 454-460.

Wick, G., Brezinschek, H. P., Hala, K., Dietrich, H., Wolf, H., and Kroemer, G. (1989). The obese strain of chickens: an animal model with spontaneous autoimmune thyroiditis. Adv Immunol *47*, 433-500.

Williamson, L., Raess, N. A., Caldelari, R., Zakher, A., de Bruin, A., Posthaus, H., Bolli, R., Hunziker, T., Suter, M. M., and Muller, E. J. (2006). Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. Embo J *25*, 3298-3309.

Winter, S. F., Minna, J. D., Johnson, B. E., Takahashi, T., Gazdar, A. F., and Carbone, D. P. (1992). Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. Cancer Res *52*, 4168-4174.

Wong, D., Phelps, R. G., and Turner, A. N. (2001). The Goodpasture antigen is expressed in the human thymus. Kidney Int *60*,1777-1783.

Wright, C., Pipingas, A., Grayson, W., and Leiman, G. (2000). Pemphigus vulgaris of the uterine cervix revisited: case report and review of the literature. Diagn Cytopathol *22*, 304-307.

Wu, H., Wang, Z. H., Yan, A., Lyle, S., Fakharzadeh, S., Wahl, J. K., Wheelock, M. J., Ishikawa, H., Uitto, J., Amagai, M., and Stanley, J. R. (2000). Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. N Engl J Med *343*, 31-35.

Wucherpfennig, K. W., Yu, B., Bhol, K., Monos, D. S., Argyris, E., Karr, R. W., Ahmed, A. R., and Strominger, J. L. (1995). Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 11935-11939.

-X Y Z-

Xue, W., Hashimoto, K., and Toi, Y. (1998). Functional involvement of urokinase-type plasminogen activator receptor in pemphigus acantholysis. J Cutan Pathol *25*, 469-474.

Yamanaka, H., Willis, E. H., Penning, C. A., Peebles, C. L., Tan, E. M., and Carson, D. A. (1987). Human autoantibodies to poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase. J Clin Invest *80*, 900-904.

Yamashina, Y., Miyagawa, S., Kawatsu, T., Iida, T., Higashimine, I., Shirai, T., and Kaneshige, T. (1998). Polymorphisms of HLA class II genes in Japanese patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens *52*, 74-77.

Yeh, S. W., Cavacini, L. A., Bhol, K. C., Lin, M. S., Kumar, M., Duval, M., Posner, M. R., and Ahmed, A. R. (2006). Pathogenic human monoclonal antibody against desmoglein 3. Clin Immunol *120*, 68-75.

Younus, J., and Ahmed, A. R. (1990). The relationship of pemphigus to neoplasia. J Am Acad Dermatol *23*, 498-502.

Zanoni, G., Navone, R., Lunardi, C., Tridente, G., Bason, C., Sivori, S., Beri, R., Dolcino, M., Valletta, E., Corrocher, R., and Pucetti, A. (2006). In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. PLoS Medicine *3*, 1637-1653.

Zhang, B., Zheng, R., Wang, J., Bu, D., and Zhu, X. (2006). Epitopes in the linker subdomain region of envoplakin recognized by autoantibodies in paraneoplastic pemphigus patients. J Invest Dermatol *126*, 832-840.

Zhao, M. L., and Fritz, R. B. (1995). The immune response to a subdominant epitope in myelin basic protein exon-2 results in immunity to intra- and intermolecular dominant epitopes. J Neuroimmunol *61*, 179-184.

Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T., and Hengartner, H. (1997). Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. Immunol Rev *156*, 199-209.

Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (2001). Regulation of the immune response by antigen. Science *293*, 251-253.

ANNEXES

ANNEXES

I. CURSUS UNIVERSITAIRE

DEA de Biologie Cellulaire – Mécanismes régulateurs de la cellule eucaryote, Rouen (2001). Mention B.

Maîtrise de Biochimie, option Microbiologie industrielle, Rouen (2000).

Licence de Biochimie, option Génétique bactérienne, Rouen (1999). Mention AB.

DEUG Sciences de la Vie, spécialité biochimie et physiologie, Rouen (1998).

Bac STL Biochimie Génie Biologique, lycée Galilée (1996). Mention AB.

II. ENSEIGNEMENTS

Enseignant vacataire en Immunologie à la Faculté des Sciences et Techniques de Rouen (2001-2002).

Enseignant de la maîtrise d'Immunologie et Mécanismes Physiopathologiques à la Faculté Mixte de Médecine et Pharmacie de Rouen (2003-2006).

III. PRESENTATIONS ORALES ET CONGRES

Conférences invitées

2° Congresso Nazionale Unificato di Dermatologia e Venereologia – Genoa, Italy (2005)

H. Mouquet, L. Drouot, M. Cerruti, C. Arnoult, F. Bonnet-Bayeux, P. Courville, P. Joly, F. Tron, D. Gilbert. Immunization of Mice with the Extracellular Domain of Desmoglein 1, the Pemphigus Foliaceus Autoantigen, Can Induce a B-Cell Tolerance Breakdown to Various Desmosome Autoantigens.

Communications internationales

ESDR – Congress of the European Society of Dermatological Research – Tubïngen, Germany (2005)

H. Mouquet, L. Drouot, M. Cerruti, C. Arnoult, F. Bonnet-Bayeux, P. Courville, P. Joly, F. Tron, D. Gilbert. Immunization of Mice with the Extracellular Domain of Desmoglein 1, the Pemphigus Foliaceus Autoantigen, Can Induce a B-Cell Tolerance Breakdown to Various Desmosome Autoantigens.

Communications nationales

CARD – Congrés Annuel de la Recherche Dermatologique – Brest, France (2005)

P. Musette, H. Mouquet, S. Jacquot, D. Gilbert, F. Huetz, J.C. Roujeau, M. D'Incan, M.S. Doutre, I. Gorin, F. Caux, C. Bedane, S. Oro, F. Tron, P. Joly. Study of the B- and T-lymphocyte responses in pemphigus patients treated by anti-CD20 immunotherapy (Rituximab).

CARD – Rouen, France (2003) *& JDP – Journées Dermatologiques de Paris – Paris, France* (2004)

H. Mouquet, L. Drouot, M. Cerruti, C. Arnoult, F. Bonnet-Bayeux, P. Courville, P. Joly, F. Tron, D. Gilbert. Immunization of Mice with the Extracellular Domain of Desmoglein 1, the

Pemphigus Foliaceus Autoantigen, Can Induce a B-Cell Tolerance Breakdown to Various Desmosome Autoantigens.

H. Mouquet, J. Leblond, L. Drouot, J. Leprince, P. Joly, F. Tron, D. Gilbert. Evidence for a desmoglein 1 truncated isoform and study of its implication in pemphigus foliaceus.

IV. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles de recherche

P. Musette, H. Mouquet, S. Jacquot, I. Dutot, D. Gilbert, M.L. Gougeon, J.C. Roujeau, M. D'Incan, C. Bedane, F. Tron, M. Hertl, P. Joly. Effects of anti-CD20 immunotherapy on humoral and cellular immune responses in pemphigus. (En préparation).

*P. Joly, H. Mouquet, J.C. Roujeau, D. Gilbert, M.L. Gougeon, M. D'Incan, C. Bedane, R. Muller, M. Hertl, P. Musette. Dramatic and long-lasting effect of anti-CD20 monoclonal antibody : rituximab on severe types of pemphigus. (En préparation).

**H. Mouquet, S. Berrih-Aknin, P. Joly, F. Tron, D. Gilbert. Transcript of desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is expressed in human thymus. (En préparation)

**H. Mouquet, S. Farci, P. Joly, L. Drouot, J. Leblond, J. Leprince, M. C. Tonon, P. Loiseau, D. Charron, B. Maillère, F. Tron, D. Gilbert. 2006. A truncated alternative spliced isoform of human desmoglein 1 contains a specific T-cell epitope binding to the pemphigus foliaceus-associated HLA class II DRβ1*0102 molecule. *J. Immunol.* 177: 6517-6526.

**H. Mouquet, L. Drouot, R. Charlionet, C. Arnoult, F. Bonnet-Bayeux, M. Thomas, J. Leprince, P. Joly, F. Tron, D. Gilbert. 2006. Proteomic analysis of the autoantibody response following immunization with a single autoantigen. *Proteomics* 6:4829-4837.

M. Kallel Sellami, M. Ben Ayed, H. Mouquet, L. Drouot, M. Zitouni, M. Mokni, M. Cerruti, H. Turki, B. Fezza, I. Mokhtar, A. Ben Osman, A. Zahaf, MR. Kamoun, P. Joly, H. Masmoudi, S. Makni, F. Tron , D. Gilbert. 2004. Anti-desmoglein 1 antibodies in healthy subjects : arguments for the role of environnemental factors in the occurrence of Tunisian pemphigus foliaceus. *Clin. Exp. Immunol.* 137:195-200.

P. Martel, P. Loiseau, P. Joly, M. Busson, V. Lepage, H. Mouquet, P. Courville, B. Flageul, D. Charron, P. Musette, D. Gilbert, F. Tron. 2003. Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1*03 allele. *J. Autoimmun.* 20:91-95.

Articles de revue

H. Mouquet, F. Tron. Alternative spliced autoantigens: Implications in autoimmune diseases. (En préparation)

F. Tron, D. Gilbert, P. Joly, H. Mouquet, L. Drouot, M. Ben Ayed, M. Sellami, H. Masmoudi, S. Makni. 2006. Immunogenetics of pemphigus : An update. *Autoimmunity* (Sous presse).

H. Mouquet, P. Joly. 2006. Ce qu'il faut retenir et comprendre des antigènes de la pemphigoïde bulleuse. *Dermatologie Pratique* 298: 8-10.

*F. Tron, D. Gilbert, H. Mouquet, P. Joly, L. Drouot, S. Makni, H. Masmoudi, D. Charron, M. Zitouni, P. Loiseau, M. Ben Ayed. 2005. Genetic factors in pemphigus. *J. Autoimmun.* 24:319-28.

*H. Mouquet, D. Gilbert, P. Musette, F.Tron, P. Joly. 2004. Molecular advances in pathogenesis of autoimmune blistering skin diseases. *Ann. Dermatol. Venereol.* 132:231-42.

H. Mouquet, D. Gilbert, P. Joly, F. Tron. 2004. Aspects moléculaires des maladies autoimmunes cutanées bulleuses. *Immunoanalyses et biologie spécialisée* 19:31-41.

Ouvrage

H. Mouquet, P. Musette. Les maladies bulleuses. *In Immunité cutanée acquise. Immunologie cutanée.* F. Bérard, J. Thivolet J.F. Nicolas, eds (John Libbey Eurotext) Paris, 2004. p43-64.

**** : ces articles sont présentés ci-dessous.***
***** : ces articles font l'objet de cette thèse.***

Dramatic and long-lasting effect of anti-CD20 monoclonal antibody : rituximab on severe types of pemphigus.

Pascal JOLY M.D., Ph.D. [(1)], Hugo MOUQUET Ph.D. [(2)], Jean-Claude ROUJEAU M.D. [(3)], Danièle GILBERT Ph.D. [(2)], Marie-Lise GOUGEON Ph.D. [(4)], Michel D'INCAN M.D., Ph.D. [(5)], Christiophe BEDANE M.D., Ph.D. [(6)], Ralf MULLER Ph.D.[(7)], Michael HERTL M.D., Ph.D [(7)], Philippe MUSETTE M.D., Ph.D. [(2)].

[1] Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Rouen, France.

[2] INSERM U519, Rouen University Hospital, Rouen, France.

[3] Department of Dermatology, Henri Mondor University Hospital, Créteil, France.

[4] Antiviral Immunity, Biotherapy and vaccine Unit, Department of Molecular Medicine Pasteur Institute, Paris, France.

[5] Department of Dermatology, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France.

[6] Department of Dermatology, Limoges University Hospital, Limoges, France.

[7] Department of Dermatology and Allergology, Faculty of Medicine Philipp University, Marbug, Germany.

Financial supports :

- French Society of Dermatology, Paris, France
- Roche, France

Correspondance :

Prof. P.JOLY

Clinique Dermatologique – Hôpital Charles Nicolle

1 rue de Germont

F 76031 ROUEN cedex

France

Phone number : (33) 2 32 88 68 41

Fax number : (33) 2 32 88 88 55

e-mail : Pascal.Joly@chu-rouen.fr

Pemphigus represents a paradigm of organ-specific autoimmunity (1). This blistering disease affecting the skin and mucous membranes is mediated by pathogenic autoantibodies directed against adhesion molecules of the epidermis : desmoglein1 (Dsg1) and desmoglein3 (Dsg3) that are responsible for the cohesion between keratinocytes in skin and mucosae, respectively (2-4). The condition is severe, namely in patients with recalcitrant types of the disease or with relapses that lead to severe adverse effects of corticosteroid (CS) and immunosuppressive drugs.

Rituximab, a humanized monoclonal antibody directed against the CD20 antigen of B-lymphocytes, has been demonstrated to be effective in various autoimmune diseases and in occasional cases of life-threatening pemphigus (3). We report on the first multicentre prospective series of patients with severe types of pemphigus treated by rituximab, with a two-year follow-up and extensive immunological evaluation.

The study was approved by the Seine Maritime ethics committee. Patients with severe pemphigus vulgaris (PV), pemphigus foliaceus (PF) or paraneoplastic pemphigus (PNP) were included if they either i) failed to respond to a 8-week treatment with prednisone 1.5 mg/kg/day (group 1), or ii) experienced at least two relapses despite a minimal prednisone dose of 20 mg/day (group 2), or iii) had contraindications to CS due to severe associated conditions (group 3). These latter patients were treated with rituximab alone without CS. Rituximab was administrated intravenously at a dosage of 375 mg/m^2 on days 1,8, 15 and 22. Patients were evaluated both clinically and biologically every month during the first year of follow-up and every other month during the second year. Primary endpoint was complete remission (CR) 3 months after the last infusion of rituximab.

Twenty-two patients (15 males, 7 females ; 14 PV,7 PF, 1 PNP) were included in the study. Their mean age was 52.8 $\pm$ 16.0 years-old. Main patients' clinical data at baseline are indicated in Table 1. All patients from groups 1 and 2 were previously treated with various immunosuppressive drugs and/or IV Ig without success. Severe associated medical conditions or CS side-effects were present at baseline in 2 of 6, 7 of 11 and 5 of 5 patients from groups 1, 2 and 3, respectively.

Nineteen of 22 patients (86 %) experienced CR on day 90, including 5 of 6, 10 of 11 and 4 of 5 patients from group 1, 2 and 3, respectively. Two PV patients in partial remission (PR) on day 90, had delayed CR on days 180 and 560, respectively.

A PF patient with erythroderma was considered as treatment failure. Mean delay to achieve CR was 68.9 ± 22.8 days.

Seven of the 21 patients (33 %) who achieved CR, relapsed after a mean time of 403 ± 186 days (1 of 6, 2 of 9 and 4 of 5 from groups 1, 2 and 3, respectively). Three relapsing PV patients had mild oral erosions, and 3 PF and 1 PV patients had limited cutaneous lesions involving 1 to 3 % of the body surface area. These relapses were treated with only topical CS in two patients and by a moderate increase of oral CS in three others. The last two relapsing patients were treated by a second course of rituximab because of old age and severe diabetes mellitus, and had again a CR. After a mean follow-up period of 23 months, 17 patients (77 %) were in CR. Mean dose of prednisone of patients from group 1 and 2 decreased from 100.0±17.9 mg/day and 29.1±13.0 mg/day at baseline, to 7.8±6.2 mg/day and 5.9±3.8 mg/day at the end of the study, (p=0.03 and p=0.001, respectively)(non-parametric test of Wilcoxon). Two patients developed septicaemia, one of whom with a rheumatoid arthritis concomitantly treated with anti-TNF, died.

Peripheral blood (PB) lymphocyte subpopulations and T-lymphocyte cytokine production were evaluated by flow cytometry analysis using a large panel of monoclonal antibodies : B-cells decreased dramatically from baseline : median 275.10^6/L (range $29\text{-}752.10^6$/L) to day 21 : 0.10^6/L (range $0\text{-}1.10^6$/L) and remained undetectable until day 180 in all but 2 patients, one of whom relapsed on day 120. Reappearance of B-cells began between day 180 and day 270. 90 % of them expressed a CD19 + CD27 – naïve phenotype. Interestingly, 29 % had a CD19 + $CD30^{high}$ $CD24^{high}$ transitional phenotype suggestive of B-cells migrating from the bone marrow to the periphery. No major change in T-cell, NK-cell, nor T-cell cytokine production were detected after rituximab treatment.

Using the immunoscope method (6), we followed the evolution of the repertoire of IgG, IgA and IgM in blood B-lymphocytes of one patient. Before treatment, a weak expanded peak was observed in the VH3b family of the variable portion of the heavy chains, suggesting a specific immune response. Six months later, reappearing blood B-cells had a normal Gaussian profile of the 3 VH families, similar to that found in cord blood naïve B-cells, whereas the initially expanded B-cell population was no more detectable.

Next, we evaluated patients autoantibody response using recombinant Dsg1 and Dsg3 ELISA tests (MBL, Nagano, Japan). A dramatic decrease of anti-Dsg1 and anti-Dsg3 antibodies was observed after rituximab treatment, in the 6 PF and in 9 of 12 PV patients who experienced CR (Fig 1), whereas persistent high titres were observed in the one PF patient with treatment failure and in the two PV patients in PR. During the evolution, high titres of anti-Dsg1 and anti-Dsg3 antibodies were observed in the four and three patients with cutaneous and mucosal relapse, respectively. Surprisingly, 5 PV patients had persistent high titres or a re-increase of anti-Dsg3 antibodies while still being in CR (Fig1C). To disentangle this discrepancy, we tested these sera by an ELISA technique using recombinant proteins of the $EC_{1-2-3-4-5}$ domains of Dsg3 (7). Interestingly, antibodies reacting with epitopes of the EC_{1-2} domains which are considered as the main pathogenic antibodies, decreased dramatically after rituximab treatment and remained undetectable until day 540 (Fig1D-E)). Plasma antibodies against recall antigens (pneumococcal capsule polysaccharide and tetanus toxin) were not significantly altered on days 0, 21 and 90 (p=0.25;p=0.80 and p=0.16;p=0.9)respectively. Taken together, these findings suggest some specificity of the effect of rituximab on autoantibody production.

Findings of this study show that rituximab is a very effective treatment of severe types of pemphigus. Overall, it permitted both a major and prolonged clinical improvement and a substantial decrease of CS doses. Despite the possibility of severe side-effects, it may be considered as a first line treatment in patients with severe contraindication to oral CS and in those with recalcitrant types of pemphigus.

The reappearance of naïve B-cells with a normal Gaussian repertoire suggests the possibility of definitive healing of the disease in some patients.

Legend to Figure

Evolution of anti-desmoglein 1 and anti-desmoglein 3 IgG antibodies in pemphigus patients treated with rituximab.

Anti-desmoglein1 antibody titres in PF, PV and PNP patients with persistent complete remission (Panel A) or cutaneous relapses during the evolution (arrows) (Panel B) ; anti-desmoglein 3 antibody titres in PV and PNP patients with persistent CR (Panel C) or with mucosal relapses (arrows) (Panel D) ; anbibodies directed against the recombinant proteins of the $EC_{1-2-3-4-5}$ domains of Dsg3 in a PV patient in CR with persistent high titres of antibodies directed against the whole extracellular domain of Dsg3 (□) (Panel E).

Patients	Group 1 (n = 6)	Group 2 (n = 11)	Group 3 (n = 5)
Sex M/F	3/3	7/4	5/0
Age ✷	52.8 ± 20.6	47.5 ± 13.1	64.6 ± 19.7
Type of pemphigus ✷✷			
PV	4	7	3
PF	1	4	2
PNP	1	-	-
Duration (months) of :			
Mucosal lesions✷	21.8 ± 30.5	81.0 ± 82.7	12.5 ± 7.8
Cutaneous lesions✷	45.6 ± 66.0	71.0 ± 75.0	8.0 ± 6.9
Associated medical conditions	- diabetes mellitus (n = 1) - asthma (n = 1) - myasthenia (n = 1)	- diabetes mellitus (n = 3) - arterial hypertension (n = 3) - hyperlipidemia (n = 3) - rheumatoid arthritis (n=1) - myopathy (n = 1) - depression (n = 2) - bone fracture (n = 1)	- diabetes mellitus (n = 2) - arterial hypertension (n = 2) - hyperlipidemia (n = 2) - blindness (n = 1) - bacterial meningitis (n = 1) - bone tuberculosis (n = 1) - gram negative pneumonia (n= 1) - osteonecrosis of the hip (n =1) - cardiac insufficiency (n = 1)
Previous treatment failure	- IV Ig (n = 2) - aziathioprine (n = 3) - methotrexate (n = 2)	- IV Ig (n = 1) - azathioprine (n = 3) - methotrexate (n = 3) - mycophenolate mofetil (n = 4) - cyclosporine (n = 1)	
Mean body surface area involved	40 %	17 %	16 %
Mean prednisone dose at time of rituximab infusion (mg/day) ✷	100.0 ± 17.9	29.1 ± 13.0	0

✷ mean ± SD

✷✷ PV : pemphigus vulgaris, PF : pemphigus foliaceus, PNP : paraneoplastic pemphigus.

Références :

1- Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. J Clin Invest. 1989;83:1443-8.

2- Stanley JR. Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. Adv Immunol 1993:53:291-98.

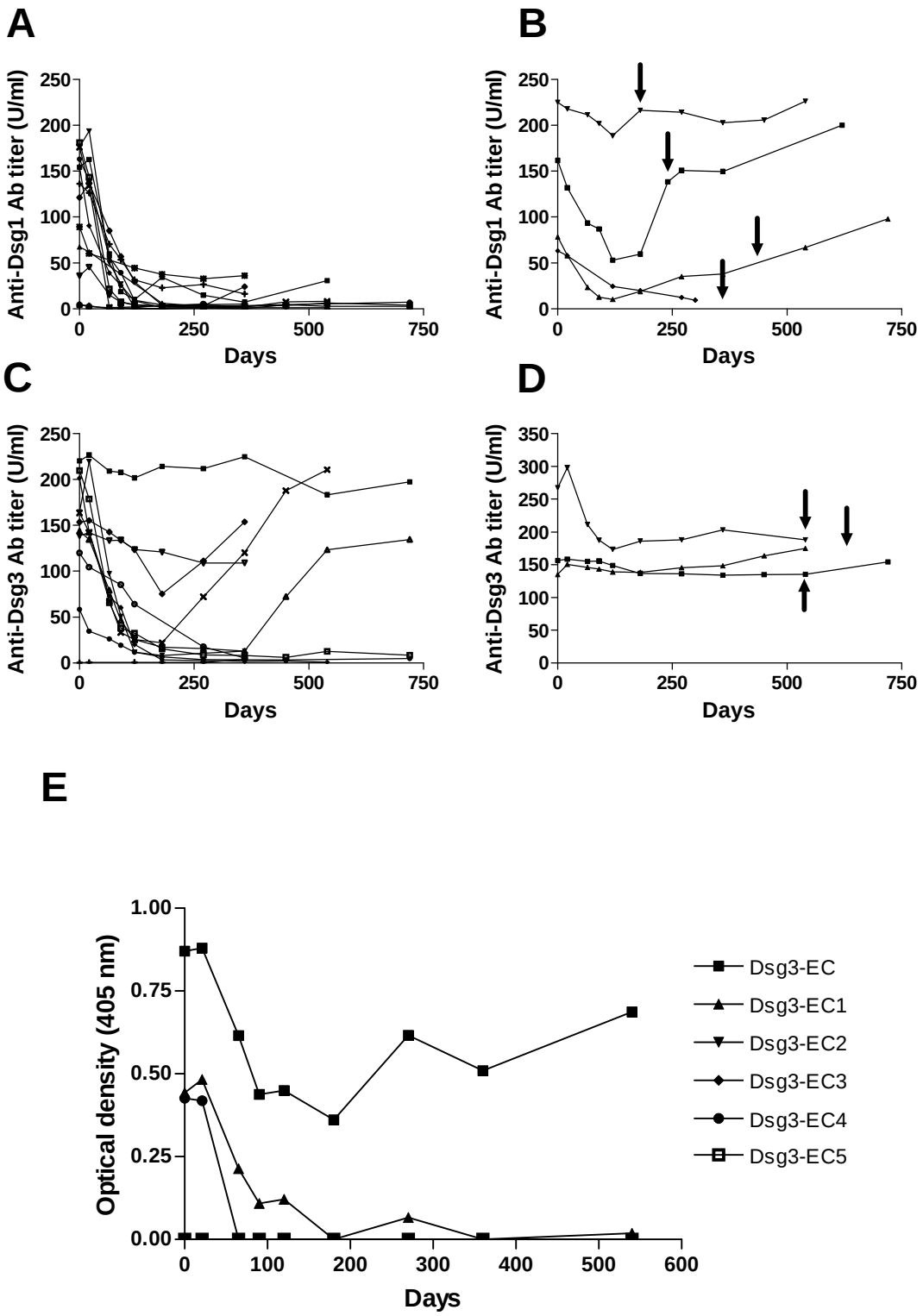
3- Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. Cell 1991; 67:869-77.

4- *à compléter*

5- El Tal AK, Posner MR, Spigelman Z, Ahmed AR. Rituximab : a monoclonal antibody to CD20 used in the treatment of pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol. 2006;449-59.

6- Mahoney MG, Wang Z, Rothenberg K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J Clin Invest. 1999;103:461-8

7- Muller R, Svoboda V, Wenzel E, Gebert S, Hunzelmann N, Muller HH, Hertl M. IgG reactivity against non-conformational NH-terminal epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris. Exp Dermatol 2006;15:606-14.


A
Anti-Dsg1 Ab titer (U/ml)
250
200
150
100
50
0
0
250
500
750
Days
B
Anti-Dsg1 Ab titer (U/ml)
250
200
150
100
50
0
0
250
500
750
Days
C
Anti-Dsg3 Ab titer (U/ml)
250
200
150
100
50
0
0
250
500
750
Days
D
Anti-Dsg3 Ab titer (U/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
0
250
500
750
Days
E
Optical density (405 nm)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
100
200
300
400
500
600
Days
Dsg3-EC
Dsg3-EC1
Dsg3-EC2
Dsg3-EC3
Dsg3-EC4
Dsg3-EC5

Articles scientifiques

Ann Dermatol Venereol
2005;132:231-42

Revue générale

Avancées moléculaires dans la physiopathologie des maladies bulleuses autoimmunes

H. MOUQUET (1), D. GILBERT (1), P. MUSETTE (1, 2), F. TRON (1), P. JOLY (1, 2)

Résumé

Les maladies bulleuses autoimmunes sont caractérisées par la production d'autoanticorps dirigés contre les structures d'adhésion de la peau. Ces maladies autoimmunes spécifiques d'organe se différencient en deux groupes, les pemphigus dans lesquels les autoanticorps reconnaissent des protéines du complexe desmosomal, et les maladies autoimmunes sous-épidermiques, caractérisées par une réactivité des autoanticorps contre des protéines de la jonction dermoépidermique. La fixation des autoanticorps à leurs cibles provoque une altération des molécules d'adhésion interkératinocytaire au cours des pemphigus ou de la jonction dermoépidermique dans les maladies sous-épidermiques, aboutissant à la formation de bulles intra ou sous épidermiques. Les efforts de recherche réalisés depuis une vingtaine d'années ont permis, l'identification des autoantigènes cibles et la caractérisation de leurs fonctions adhésives, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et le développement de nouveaux outils diagnostiques.

Summary

Autoimmune blistering skin diseases are characterized by the production of autoantibodies directed against adhesive structures of the skin. These organ specific autoimmune diseases included pemphigus in which autoantibodies target proteins of the desmosomal complex, and subepidermal autoimmune diseases characterized by autoantibodies directed against structural proteins of the dermoepidermal junction. Binding of autoantibodies to their targets induces a loss of adhesion between keratinocytes in pemphigus and alterations of the dermoepidermal junction in subepidermal autoimmune diseases. Progresses during the last twenty years had allowed the identification of target autoantigens and the characterization of their adhesive functions, a better understanding of the pathogenesis of these diseases and the development of new diagnostic tools.

Molecular advances in pathogenesis of autoimmune blistering skin diseases.
H. MOUQUET, D. GILBERT, P. MUSETTE, F. TRON, P. JOLY
Ann Dermatol Venereol 2005;132:231-42
The full text of this article is available in English, free of charge, on the Web on: www.e2med.com/ad

Les maladies bulleuses autoimmunes sont liées à la production d'autoanticorps dirigés contre des protéines de structure de la peau. Ces autoanticorps sont responsables de la formation de bulles cutanées ou muqueuses qui altèrent l'épiderme et son rôle de barrière physique vis-à-vis de l'environnement. Ces maladies autoimmunes sont classées sur des critères cliniques, histologiques et immunologiques. Elles se divisent en 2 grands groupes, les pemphigus et les maladies de la jonction dermoépidermique (JDE) comprenant : la pemphigoïde bulleuse (PB) qui est la plus fréquente des maladies bulleuses autoimmunes, la dermatose bulleuse à IgA linéaire (DBAL), la pemphigoïde cicatricielle (PC), l'épidermolyse bulleuse acquise (EBA) et la dermatite herpétiforme (DH). Les pemphigus et la PB représentent un véritable paradigme de maladies autoimmunes spécifiques d'organe médiées par les autoanticorps. Depuis une vingtaine d'années, ces maladies ont fait l'objet d'un important effort de recherche : les autoantigènes cibles ont été identifiés, leur rôle dans l'adhésion des kératinocytes a été établi, les propriétés des autoanticorps ont été précisées et de nouveaux tests diagnostiques sont actuellement proposés.

(1) INSERM U519, Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides (IFRMP23), Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rouen.
(2) Clinique Dermatologique, CHU Charles Nicolle, Rouen.

Tirés à part : H. MOUQUET, INSERM U519, Faculté de Médecine et Pharmacie, 22, boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex.
E-mail : hugo.mouquet@etu.univ-rouen.fr

Les autoantigènes cibles

Au cours des maladies autoimmunes cutanées bulleuses, les autoanticorps sont dirigés contre des constituants protéiques *(tableau I)* qui appartiennent soit aux desmosomes qui assurent la jonction entre les kératinocytes *(fig. 1)*, soit aux structures responsables de l'adhésion de l'épiderme au derme. Ces structures, constituant la JDE, sont, d'une part, le complexe hémidesmosome/filaments d'ancrage qui fixe les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme à la membrane basale et, d'autre part, les fibrilles d'ancrage qui amarrent la membrane basale au derme *(fig. 2)*. La localisation des autoantigènes reconnus par ces autoanticorps a été précisée par des techniques d'immunofluorescence et d'immunomicroscopie électroni-

Tableau I. – Autoantigènes majeurs des maladies bulleuses autoimmunes.

Maladies bulleuses	Autoantigène (poids moléculaire)
Pemphigus :	
Pemphigus superficiel	Desmogléine 1 (160 kDa)
Pemphigus vulgaire	Desmogléine 3 (130 kDa)
	Desmogléine 1
Pemphigus herpétiforme	Desmogléine 1
	Desmogléine 3 (occasionnellement)
Pemphigus à IgA	Desmocolline 1 (105-115 kDa)
	Desmogléine 1
	Desmogléine 3 (occasionnellement)
Pemphigus paranéoplasique	*Complexe paranéoplasique* :
	HD1-Plectine (500 kDa)
	Desmoplakine I (250 kDa)
	BPAG1 (230 kDa)
	Desmoplakine II (210 kDa)
	Envoplakine (210 kDa)
	Périplakine (190 kDa)
	Inconnu (170 kDa)
	Desmogléine 1
	Desmogléine 3
Dermatoses de la jonction dermoépidermique :	
Pemphigoïde bulleuse	BPAG1 (230 kDa)
	BPAG2 (180 kDa)
Pemphigoïde gestationis	BPAG2
Pemphigoïde cicatricielle	BPAG2
	BPAG1
	Laminine 5 et 6
	Collagène VII (chaîne *a* 1 de 290 kDa)
	Sous unité *ß*4 (200 kDa) intégrine *a* 6*ß*4
Dermatose à IgA linéaire	BPAG2 et ses fragments protéolytiques
	LABD-1 (120 kDa) et LABD97 (97 kDa)
Epidermolyse bulleuse acquise	Collagène VII
Dermatite herpétiforme	Transglutaminase épidermique (TGase 3)

que. Les techniques d'immunoprécipitation et d'immunoempreinte ont permis de déterminer leur poids moléculaire *(fig. 3)*. Les techniques de biologie moléculaire notamment le criblage de banques d'expression d'ADNc de kératinocytes à l'aide de sérum de malades ont permis le clonage des gènes codant pour ces autoantigènes, et la production des autoantigènes sous forme recombinante. Ces protéines recombinantes ont permis d'établir la cartographie des épitopes reconnus par les lymphocytes T et B autoréactifs et sont actuellement utilisées dans les techniques de diagnostic par ELISA.

Les desmogléines

Les desmogléines (Dsg) comme les desmocollines (Dsc) sont des glycoprotéines transmembranaires, calcium-dépendantes, qui appartiennent à la famille des cadhérines desmosomales. Il existe 4 isoformes de Dsg (Dsg1 à Dsg4) qui sont composées d'une région extracellulaire organisée en 5 domaines (EC1 à EC5), d'un segment transmembranaire et d'une région intracytoplasmique *(fig. 4)*. Ces protéines adhèrent entre-elles dans l'espace interkératinocytaire ou desmoglie par des interactions homotypiques (interactions entre protéines homologues) de leurs domaines extracellulaires (EC1 et EC2). Elles sont liées aux filaments intermédiaires de cytokératine via les protéines de la plaque desmosomale (plakoglobine et desmoplakine) [1]. L'expression de la Dsg2 et vraisemblablement de la Dsg4 (nouvelle isoforme récemment décrite) est ubiquitaire ; celle de la Dsg1 et la Dsg3 est limitée à l'épiderme et aux muqueuses. La Dsg1 est exprimée selon un gradient croissant des couches profondes vers les couches les plus superficielles de l'épiderme alors que la Dsg3 et la Dsg4 présentent une expression restreinte aux kératinocytes des couches basales de l'épiderme [2, 3].

La Dsg1 (160 kDa) est l'autoantigène majeur des pemphigus superficiels et la Dsg3 (130 kDa) l'autoantigène du pemphigus vulgaire. Cependant, cette dichotomie de la réponse autoimmune au cours des pemphigus n'est pas aussi tran-

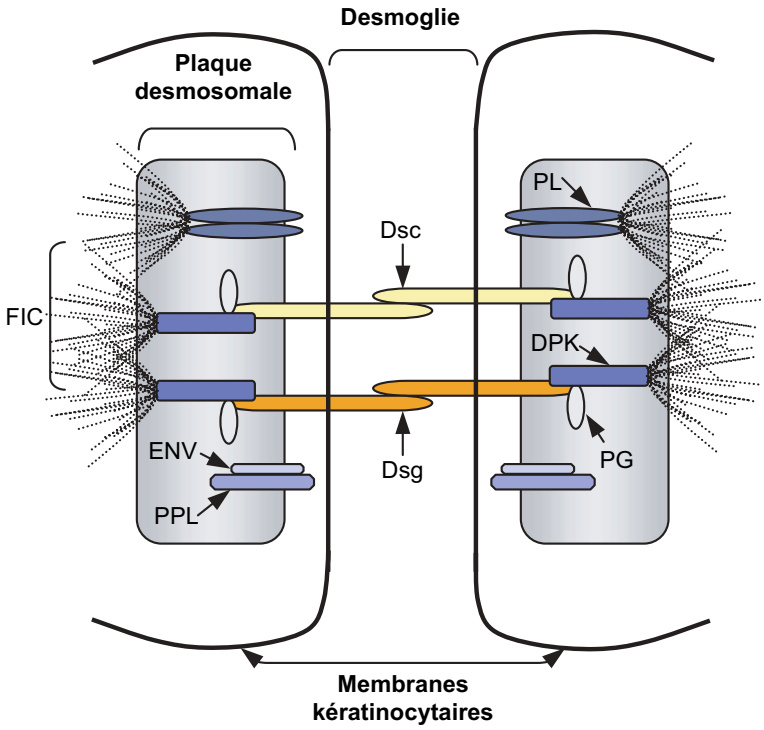


Fig. 1. Organisation moléculaire du desmosome. Le desmosome assure l'adhésion cellulaire entre deux kératinocytes adjacents. Il est constitué, d'une part, de glycoprotéines transmembranaires appartenant à la famille des cadhérines desmosomales (les desmogléines **(Dsg)** et les desmocollines **(Dsc)**) qui forment la desmoglie et, d'autre part, de protéines cytosoliques, les plakines (les desmoplakines **(DP)**, la plectine **(PL)**, l'envoplakine **(ENV)** et la périplakine **(PPL)**) et la plakoglobine **(PG)** qui forment la plaque desmosomale. Les cadhérines desmosomales interagissent : (i) entre-elles par leur extrémité N-terminale, (ii) avec la PG et les DP par leur domaine cytosolique. Les filaments intermédiaires de cytokératine **(FIC)** sont fixés à la plaque desmosomale via des interactions avec les DP et la PL.

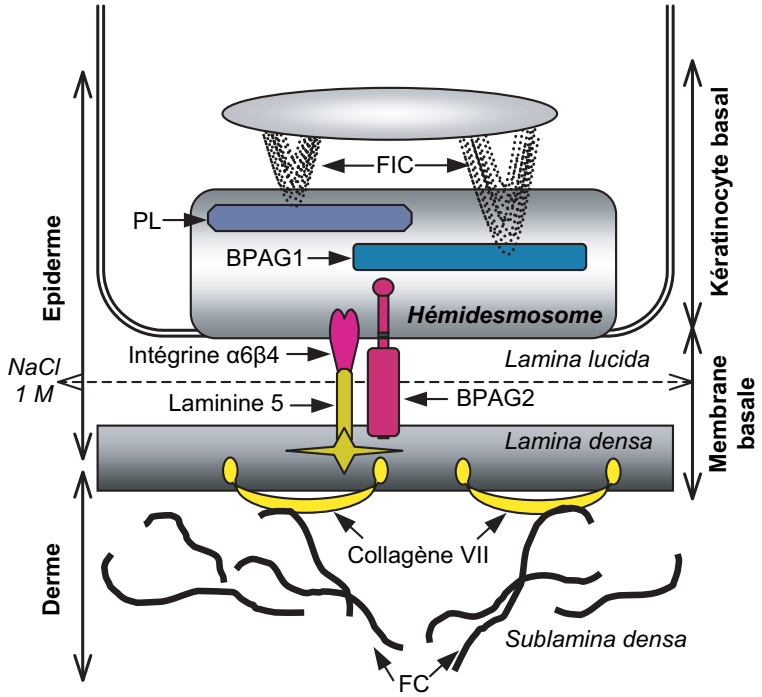


Fig. 2. Organisation moléculaire de la jonction dermoépidermique. La jonction dermoépidermique constitue une zone d'adhésion entre l'épiderme et le derme. Cette adhésion est assurée par la triade ; hémidesmosomes, filaments d'ancrage et fibrilles d'ancrage. Les complexes hémidesmosomes/filaments d'ancrage permettent l'ancrage des kératinocytes basaux à la membrane basale composée de 2 lames ; la lamina lucida et la lamina densa. Les protéines intracellulaires **BPAG1** et plectine **(PL)**, sont localisées dans la plaque hémidesmosomale interne et interviennent dans la fixation du cytosquelette (filaments intermédiaires de cytokératine **(FIC)**) aux hémidesmosomes. La PL et BPAG1 interagissent avec l'**intégrine α 6ß4** et avec la protéine **BPAG2**. Ces protéines transmembranaires ancrent les cellules basales au niveau de la plaque hémidesmosomale externe sur la membrane basale via leurs interactions avec la **laminine 5**, principale composante des filaments d'ancrage. Cette dernière interagit dans la lamina densa avec le **collagène de type VII**, constituant majeur des fibrilles d'ancrage, qui se projette dans une région dénommée sublamina densa, permettant ainsi la fixation de la membrane basale au derme sous-jacent. L'incubation de peau humaine avec une solution de NaCl 1 M provoque la séparation de l'épiderme du derme au niveau de la lamina lucida. **FC** : fibrilles de collagène.

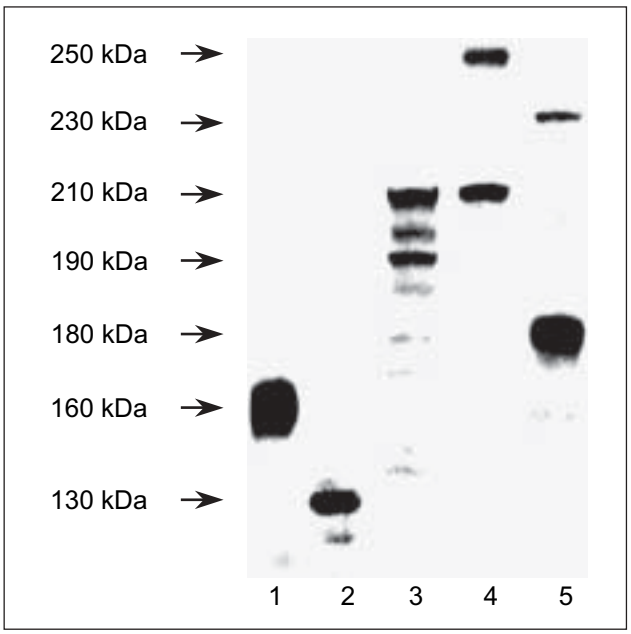


Fig. 3. Immunoempreintes sur extrait protéique d'épiderme humain permettant la caractérisation des autoantigènes par leur poids moléculaire. En immunoempreinte sur un extrait d'épiderme humain, les sérums de malades atteints de pemphigus superficiel (1) et de pemphigus vulgaire (2) reconnaissent respectivement la desmogléine 1 **(Dsg1)** de 160 kDa et la desmogléine 3 **(Dsg3)** de 130 kDa. Les sérums de pemphigus paranéoplasique réagissent le plus fréquemment avec un doublet protéique de : (i) 190-210 kDa correspondant à la périplakine **(PPL)** et à l'envoplakine **(ENV)** (3), (ii) 250-210 kDa correspondant aux desmoplakines I et II **(DPK1** et **DPK2)** (4). Dans la pemphigoïde bulleuse, la réactivité anticorps présente dans le sérum des malades (5) est dirigée contre les 2 antigènes de la pemphigoïde bulleuse, **BPAG1** (230 kDa) et **BPAG2** (180 kDa).

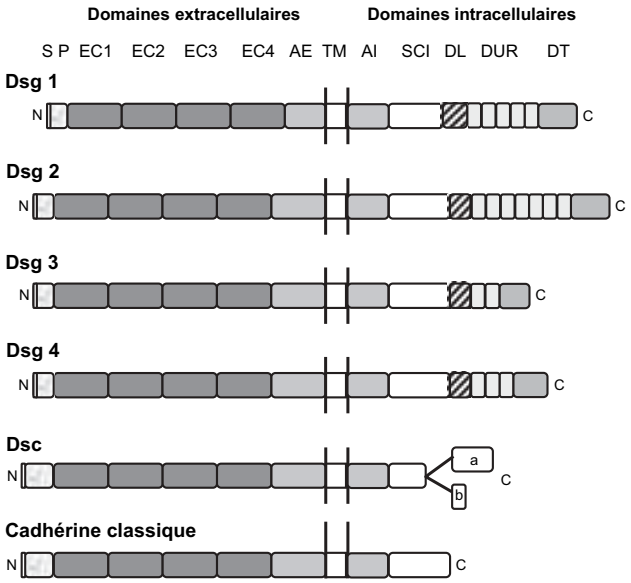


Fig. 4. Structure des cadhérines desmosomales. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires synthétisées sous forme de précurseur inactif, possédant un peptide signal **(S)** et une proséquence **(P)** qui est clivée au cours de leur maturation. Les cadhérines sont composées de 4 domaines extracellulaires **(EC)**, d'un domaine ancrage extracellulaire **(AE)**, d'une région transmembranaire **(TM)**, d'un domaine d'ancrage intracellulaire **(AI)** et d'un domaine très conservé dans la région cytosolique (**SCI** ; segment cadhérine intracellulaire). La région intracellulaire des Dsg contient en plus, un domaine de liaison riche en prolines **(DL)**, un domaine d'unités répétées **(DUR)** de 29 ± 1 résidus, caractéristiques de ces protéines ainsi qu'un domaine C-terminal **(DT)**. Chaque isotype de Dsc possèdent un domaine C-terminal spécifique **a** ou **b**, dérivé d'un épissage alternatif.

chée. En effet, des autoanticorps anti-Dsg1 et anti-Dsg3 peuvent être détectés chez les malades atteints d'autres formes de pemphigus [4].

Les plakines

Les plakines ou protéines de la plaque desmosomale, l'HD1-plectine, les desmoplakines 1 et 2, l'envoplakine et la périplakine sont reconnues par les autoanticorps produits par les malades atteints de pemphigus paranéoplasique. Toutefois, des études récentes suggèrent que l'envoplakine et la périplakine sont aussi la cible des autoanticorps dans les pemphigus vulgaire et superficiel [5, 6].

Les plakines constituent une famille de protéines de structure commune organisée en 3 domaines : un domaine N-terminal globulaire permettant leur association à la plaque desmosomale, un domaine central hélicoïdal assurant l'homodimérisation des plakines et un domaine C-terminal globulaire qui participe à l'ancrage des filaments intermédiaires de cytokératine aux desmosomes *(fig. 5)*. Elles contribuent par cette fonction d'ancrage, à l'intégrité structurale des kératinocytes. Les desmoplakines sont les plus abondants des composants desmosomaux. Les deux isoformes DPK1 (250 kDa) et DPK2 (210 kDa) synthétisées par épissage alternatif, se lient par leur domaine N-terminal à la région cytoplasmique des cadhérines desmosomales directement ou par l'intermédiaire de la plakoglobine. La plectine d'environ 500 kDa, coopère avec les desmoplakines dans leur fonction de couplage des filaments intermédiaires aux desmosomes. Cette phosphoprotéine intracellulaire d'expression ubiquitaire, est aussi présente dans la plaque interne des hémidesmosomes. L'envoplakine de 210 kDa et la périplakine de 190 kDa sont des constituants de l'enveloppe cornée de l'épiderme pouvant former des homodimères ou des hétérodimères. Le rôle d'ancrage de ces protéines est similaire à celui des autres plakines [7, 8].

BPAG1 et BPAG2, les antigènes de la pemphigoïde bulleuse

Les autoanticorps présents chez les malades atteints de PB sont dirigés contre 2 protéines hémidesmosomales, BPAG1 et BPAG2. Les antigènes BPAG1 et BPAG2 sont aussi reconnus par les autoanticorps produits au cours d'autres maladies bulleuses autoimmunes *(tableau I)*.

La protéine BPAG1 (BP230) de 230 kDa, synthétisée par les kératinocytes de la couche basale épidermique, appartient à la famille des plakines décrite ci-dessus *(fig. 5)*. Elle est localisée dans la plaque hémidesmosomale interne où elle contribue à l'organisation du cytosquelette par la fonction de son extrémité C-terminale qui assure l'ancrage des filaments intermédiaires de cytokératine à la plaque hémidesmosomale. Une région N-terminale de BPAG1 interagit avec les domaines intracytoplasmiques de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et de BPAG2.

BPAG2 (BP180 ou collagène de type XVII) est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 180 kDa constituée d'un domaine C-terminal extracellulaire de collagène, d'une portion transmembranaire et d'un domaine N-terminal intracellulaire *(fig. 6)*. Sur le plan conformationnel, BPAG2

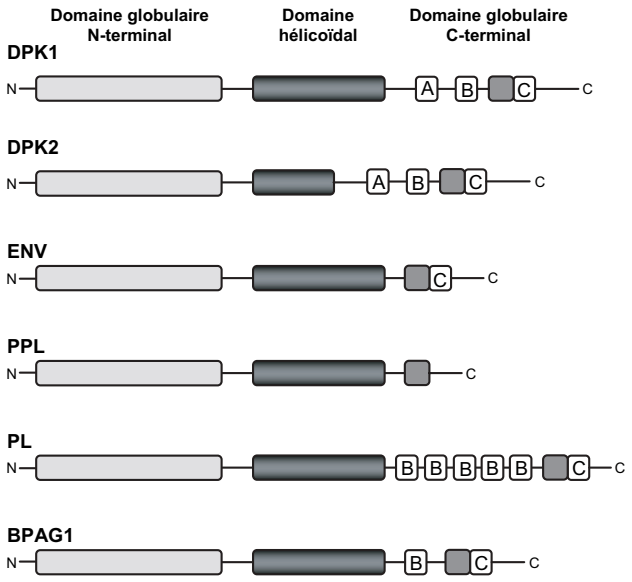


Fig. 5. Structure des plakines. Quatre plakines sont présentes au niveau de la plaque desmosomale ; les desmoplakines **(DP)**, l'envoplakine **(ENV)**, la périplakine **(PPL)** et la plectine **(PL)**. Cette dernière est aussi localisée au niveau de la plaque hémidesmosomale comme une autre plakine, l'antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse **(BPAG1)**. Les plakines partagent une structure commune faite de deux domaines globulaires N- et C- terminaux séparés par un domaine central hélicoïdal (rod domain). Le domaine N-terminal est constitué d'hélices *a* antiparallèles. Le domaine C-terminal est composé d'un nombre variable de domaines conservés au sein de la famille (A, B ou C) qui sont absents de la structure des PPL. Le domaine central permet une homodimérisation par la formation d'une double hélice *a*.

possède une tête globulaire, une tige centrale proche de la membrane correspondant à une séquence de 73 aminoacides nommée NC16A et au domaine de collagène le plus large (Coll. 15), et une queue flexible renfermant le reste des domaines de collagène (Coll. 1 à 14) interrompus par des séquences non collagéniques. La région de BPAG2, proche de la membrane du kératinocyte, interagit avec l'intégrine α6ß4 alors que l'extrémité C-terminale de la protéine traverse la lamina densa de la membrane basale et interagit avec la laminine 5 [9, 10]. Des interactions supplémentaires entre BPAG2 et les protéines de la plaque hémidesmosomale (plectine et BPAG1) pourraient stabiliser davantage la JDE. BPAG2 s'observe sous 2 formes : une forme complète transmembranaire et une forme soluble de 120 kDa appelée LABD-1 (linear IgA bullous dermatosis antigen) ou « ladinine » correspondant au domaine extracellulaire, clivé par protéolyse de la surface cellulaire et intégré à la membrane basale (fig. 6). Ce clivage de BPAG2 résulte de l'activité enzymatique de métalloprotéases membranaires appartenant à la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase). Un second fragment du domaine extracellulaire d'un poids moléculaire 97 kDa (LABD97) peut être extrait de l'épiderme et semble résulter d'une dégradation de l'antigène LABD-1 (fig. 6) [11].

L'intégrine α6ß4, les laminines 5/6 et le collagène VII

A côté de la réactivité dirigée contre les antigènes de la PB, les sérums des malades atteints de PC reconnaissent d'autres protéines de la JDE comme l'intégrine α6ß4, les laminines 5/6 et le collagène VII, autoantigène de l'épidermolyse bulleuse acquise (EBA).

L'intégrine α6ß4 est un récepteur transmembranaire exprimé par les kératinocytes des assises basales de l'épiderme. Cette glycoprotéine hémidesmosomale est un hétérodimère composé des sous-unités α6 (120 kDa) et ß4 (200 kDa) *(fig. 7)*. Elle est connectée au réseau de filaments intermédiaires de cytokératine assurant ainsi la liaison entre ces filaments et la matrice extracellulaire de la membrane basale. L'intégrine α6ß4 interagit à la fois avec la plectine et la protéine BPAG2. Dans la lamina lucida, elle est associée par sa région extracellulaire à la laminine 5 qui joue le rôle de ligand de cette intégrine.

Les laminines représentent une famille de glycoprotéines assemblées en hétérotrimère de 3 chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures, les sous-unités α, ß et γ *(fig. 7)*. La laminine 5 (600 kDa) est constituée des sous-uni-

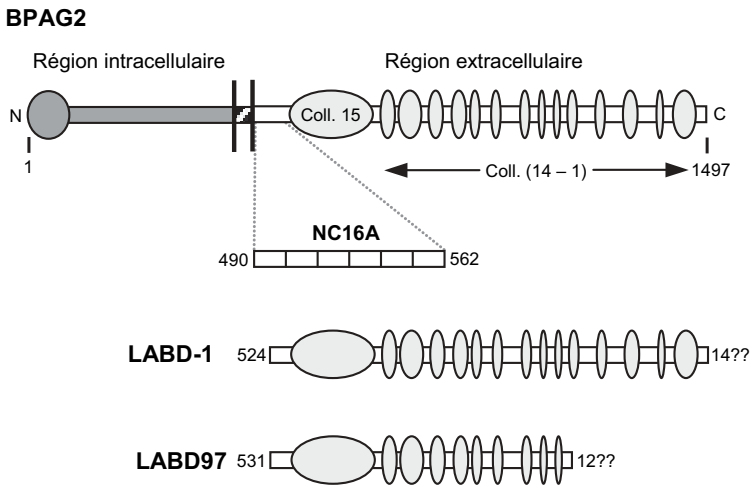


Fig. 6. Stuctures de la protéine BPAG2 et de ses fragments protéolytiques (LABD-1 et LABD97). La protéine hémidesmosomale BPAG2 est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 180 kD. Elle est constituée d'un domaine intracellulaire caractérisée par une structure globulaire à son extrémité N-terminale, d'une portion transmembranaire et d'un domaine C-terminal extracellulaire dont la conformation est arrangée en 15 domaines de type collagène (Coll. 1 à Coll. 15) interrompue par des séquences non collagéniques. Le domaine extracellulaire contient une séquence de 73 aminoacides, NC16A, localisée entre la région transmembranaire et le domaine Coll. 15 de BPAG2. Les protéines LABD-1 (120 kDa) et LABD97 (97 kDa) sont issues de la protéolyse de la région extracellulaire de BPAG2. Les extrémités C-terminales de ces fragments ne sont pas encore définies.

tés α3 (200 kDa), ß3 (155 kDa) et γ2 (140 kDa) et est exprimée spécifiquement au niveau de la JDE de la peau humaine comme la laminine 6. La laminine 5 située à la jonction *lamina lucida — lamina densa*, est synthétisée par les kératinocytes et les fibroblastes dermiques. Elle constitue la composante majeure des filaments d'ancrage qui assure la fixation des hémidesmosomes à la membrane basale. Elle peut s'associer par des liaisons covalentes à la laminine 6 (α3ß1γ1), avec laquelle elle possède des similarités structurales et immunologiques dont la sous-unité α3 commune à ces 2 isoformes. Ce complexe laminine 5/6 ancre les kératinocytes basaux à la membrane basale en connectant les protéines hémidesmosomales, intégrine α6ß4 et BPAG2, à certains composants de la *lamina densa* tels que les collagènes de type IV et VII.

Le collagène de type VII, protéine fibrillaire de 1 000 kDa synthétisée par les kératinocytes et les fibroblastes dermiques, constitue le composant majeur des fibrilles d'ancrage. Cette protéine est un homotrimère composé de 3 chaînes hélicoïdales α1 (VII) identiques (d'environ 300 kDa chacune), torsadées en une superhélice. Chaque chaîne est constituée d'un domaine collagénique central flanqué d'un domaine globulaire N-terminal de 145 kDa (NC1) et d'un domaine globulaire C-terminal de 30 kDa (NC2) *(fig. 7)*. Après sécrétion, les molécules de collagène VII forment des dimères anti-parallèles (le domaine NC2 étant protéolysé) par l'intermédiaire de ponts disulfures. Ces dimères s'agrégent ensuite latéralement pour former les fibrilles d'ancrage associées en un réseau qui permet le pontage de la membrane basale (*lamina densa*) au derme sous-jacent. D'autres fibrilles de collagène VII renforcent cet amarrage par leur interaction avec des fibres interstitielles de collagène I et III présentes dans le derme [10].

Autoanticorps et physiopathologie des maladies bulleuses autoimmunes

Plusieurs arguments démontrent le rôle pathogène des autoanticorps dans ces maladies en particulier au cours du pemphigus : le parallélisme entre le taux d'anticorps circulants et l'activité de la maladie ; la survenue de cas néonataux transitoires induits par le transfert transplacentaire des autoanticorps de la mère atteinte à l'enfant ; et la démonstration de la pathogénicité des autoanticorps isolés des malades dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Les pemphigus

Les pemphigus touchent la peau et les muqueuses. Ils sont caractérisés par la production d'anticorps pathogènes dirigés contre des protéines du desmosome. La fixation de ces autoanticorps aux antigènes desmosomaux est responsable d'une perte d'adhésion interkératinocytaire appelée acantholyse et induit la formation de bulles intra-épidermiques. On distingue trois entités immuno-anatomo-cliniques : le pemphigus vulgaire (PV), le pemphigus superficiel (PS) et le pemphigus paranéoplasique (PPN).

Réactivité autoanticorps

Au cours des pemphigus, l'examen en immunofluorescence directe (IFD) d'une biopsie de peau périlésionnelle révèle des dépôts d'immunoglobulines à la surface des kératinocytes (anciennement appelée substance intercellulaire) donnant l'aspect d'une fluorescence « en résille ». La présence d'un marquage de la membrane basale oriente le diagnostic vers un PPN mais a occasionnellement été décrit dans certaines formes de PS (pemphigus de Senear Usher). Des dépôts intercellulaires de C3 sont mis en évidence dans 50 p. 100 des cas. Des dépôts intercellulaires d'IgA sont en principe caractéristiques du pemphigus à IgA. Des anticorps circulants sont détectés chez les malades, par immunofluorescence indirecte (IFI) sur coupe de peau humaine ou d'œsophage de singe et par immunoempreinte sur extrait protéique d'épiderme ou de kératinocytes humains *(fig. 3)*. Les anticorps circulants et les anticorps déposés sont essentiellement d'isotype IgG, en particulier de sous-classe IgG1 et IgG4. Les 3 grands types de pemphigus se distinguent en principe par la spécificité des autoanticorps bien qu'un chevauchement des réponses autoanticorps ait été décrit entre les différentes formes. Au cours des pemphigus superficiels, les autoanticorps sont dirigés contre la Dsg1. Dans le PV avec atteinte muqueuse exclusive, les autoanticorps sont dirigés contre la Dsg3 alors que les 2 types d'autoanticorps (anticorps anti-Dsg1 et anti-Dsg3) sont retrouvés dans le sérum des patients atteints de PV avec atteinte cutanée et muqueuse. De plus, une réactivité anti-Dsg4 a été récemment observée chez quelques patients atteints de PV [3]. Enfin, au cours du PPN, les autoanticorps reconnaissent un complexe de protéines qui est principalement composé des protéines de la famille des plakines (DPK1-2, périplakine, envoplakine, BPAG1 et plectine), et de la famille des cadhérines (Dsg3 et Dsg1) [4].

Les autoanticorps anti-Dsg présents dans le sérum des malades reconnaissent des épitopes conformationnels, calcium-dépendants, localisés principalement sur le domaine extracellulaire de ces protéines [12, 13]. Bien que la réactivité anti-Dsg soit indépendante de la glycosylation des épitopes, une étude a récemment montré la possibilité d'inhiber la fixation et l'action pathogène des anticorps anti-Dsg1 par l'utilisation d'agglutinine de plante (lectine) ou de certaines glycosydases [14]. L'étude de la cartographie épitopique de ces autoantigènes montre que la majorité des autoanticorps des malades (69,8 p. 100 des sérums de PS et 77,5 p. 100 des sérums de PV) reconnaissent l'extrémité N-terminale, notamment le domaine EC1 et une partie d'EC2 (position 1-161), précisément les épitopes formés des aminoacides 26-87 de la Dsg1 et 25-88 de la Dsg3 [15]. Cette réactivité pourrait résulter d'un mécanisme de diversification progressive de la réponse autoimmune désignée sous le terme d' « extension épitopique intramoléculaire ». Ainsi, il a récemment été montré par l'équipe de Diaz que les anticorps de patients atteints de pemphigus endémique superficiel (*fogo selvagem*), réagissent contre le domaine EC5 de la Dsg1 durant les phases de latence et/ou de rémission de la maladie, et contre le domaine EC2 pendant la phase active [16].

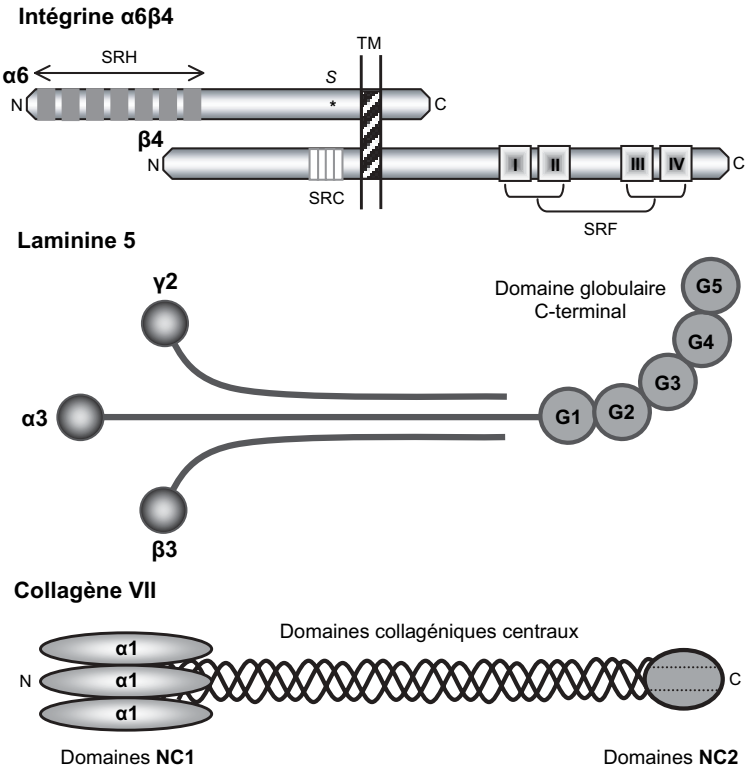


Fig. 7. Structures de l'intégrine *a*6*ß*4, de la laminine 5 et du collagène VII. L'intégrine *a*6*ß*4, récepteur transmembranaire des hémidesmosomes, est un hétérodimère composé des sous-unités *a*6 (120 kDa) et *ß*4 (200 kDa). La sous-unité *ß*4 contient dans sa région intracytoplasmique, 2 paires de séquences répétées de fibronectine type III (SRF) séparées par des segments de connection et dans sa partie extracellulaire, 4 séquences répétées riche en cystéine (SRC). La sous-unité *a*6 de la protéine comporte une tête globulaire N-terminale comprenant des séquences répétées homologues (SRH).
S : pont disulfure, TM : région transmembranaire.
La laminine 5, constituant principal des filaments d'ancrage, est une protéine hétérotrimérique composée de 3 sous-unités (*a*3*ß*3*g*2) reliées par des ponts disulfures. Contrairement à la sous-unité *ß*3 (140 kDa), les sous-unités *a*3 (200 kDa) et *g*2 (155 kDa) existent à l'état de protéines processées, respectivement de 165 kDa et 105 kDa. La sous-unité *a*3 comporte à son extrémité C-terminale, un domaine globulaire (G) subdivisé en 5 sous-domaines (G1-G5) de 180 à 200 aminoacides.
Le collagène VII, protéine fibrillaire d'environ 1 000 kDa, est le composant majeur des fibrilles d'ancrage. La molécule de collagène VII est constituée de 3 chaînes *a*1(VII) identique d'environ 300 kDa chacune, comportant 3 régions distinctes : un domaine collagénique central (145 kDa) flanqué d'un domaine globulaire N-terminal de 145 kDa (NC1) et d'un domaine globulaire C-terminal de 30 kDa (NC2).

L'immunoempreinte a été longtemps utilisée pour détecter les anticorps anti-Dsg. Sa sensibilité est limitée du fait de la dénaturation des antigènes. Des tests ELISA utilisant les Dsg1 et Dsg3 recombinantes ont donc été développés. Ils ont une sensibilité et une spécificité de l'ordre de 95 p. 100 [17, 18], et permettent de suivre l'évolution de la maladie [19]. Les tests ELISA actuellement commercialisés (MBL, Medical & Biological Laboratories) constituent un outil rapide de détection et de dosage des anticorps anti-Dsg.

Pathogénicité et modes d'action des autoanticorps

La pathogénicité des anticorps anti-Dsg retrouvés dans les 3 types de pemphigus a été clairement établie dans des études réalisées *in vitro* utilisant des cultures de peau humaine totale ou de kératinocytes, et *in vivo* par transfert passif chez des souriceaux nouveaux-nés d'IgG purifiées à partir de sérums de malades ou d'anticorps monoclonaux anti-Dsg [20-22]. L'expérience la plus concluante a été conduite par Amagaï *et al.* dans un modèle murin très élégant. Ce modèle de pathogénicité est fondé sur la reconstitution de souris Rag2$^{-/-}$ avec les splénocytes de souris invalidées pour la Dsg3 (Dsg3$^{-/-}$) et immunisées avec de la Dsg3 recombinante murine. Les souris Rag2$^{-/-}$ développent des lésions cutanées et muqueuses similaires à celles observées au cours du pemphigus vulgaire [23]. Les caractéristiques immunologiques et histologiques des lésions observées chez ces souris sont superposables à celles de la maladie humaine [24]. Par ailleurs, la production d'anticorps anti-Dsg3 pathogènes et la survenue du pemphigus expérimental, nécessitent la présence des populations lymphocytaires B et T [25]. Enfin, ce groupe a montré récemment que la maladie peut être induite par transfert passif chez les souris adultes normales, d'un anticorps monoclonal anti-Dsg3 dérivé des souris Rag2$^{-/-}$ receveuses des splénocytes des souris Dsg3$^{-/-}$ immunisées. Cet anticorps de sous-classe IgG1 est dirigé contre un épitope conformationnel, calcium-dépendant de l'extrémité N-terminale de la Dsg3 (1-63). Il reconnaît spécifiquement 4 résidus aminoacides (V3, K7, P8 et D59), supposés former l'interface d'adhésion des Dsg entre-elles [26]. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une altération des fonctions adhésives de la Dsg1 et de la Dsg3 par les autoanticorps produits dans les différentes formes de pemphigus. En effet, la spécificité des autoanticorps transférés (anti-Dsg3 et/ou anti-Dsg1) au souriceau nouveau-né est corrélée au phénotype clinique et histologique de la maladie développée par l'animal. La topographie dans l'épiderme des lésions cutanées est donc en accord avec la distribution relative de la Dsg1, fortement exprimée au niveau des couches superficielles de la peau et celle de la Dsg3 fortement exprimée au niveau des couches basales de l'épiderme. Ainsi, l'acantholyse profonde du PV est-elle souvent la conséquence d'une action combinée d'anticorps dirigés contre la Dsg1 et contre la Dsg3. Les anticorps anti-Dsg1 seuls n'entraînent en effet qu'une acantholyse superficielle puisque la Dsg3, présente dans les couches basales, compense la perte de la fonction d'adhésion de la Dsg1 induite par les autoanticorps [27, 28]. Cette théorie de la « compensation des desmogléines » rendrait compte de l'absence de PS néonatal à l'inverse du PV néonatal. En effet, contrairement à l'adulte, la Dsg3 serait coexprimée chez le

nouveau-né avec la Dsg1 dans les couches superficielles où elle compenserait le défaut d'adhésion induit par les autoanticorps ne rendant possible la survenue d'un pemphigus néonatal que par la transmission transplacentaire d'anticorps anti-Dsg1 et anti-Dsg3 [29].

Le dogme établi stipulant que, seules des IgG anti-Dsg1/Dsg3 ont la capacité d'induire un pemphigus chez la souris par transfert passif a été récemment remis en cause par les travaux de l'équipe de Grando. Ces auteurs montrent que 85 p. 100 des patients atteints de pemphigus, développent des autoanticorps pathogènes dirigés contre des antigènes kératinocytaires différents des Dsg. Ces auteurs ont identifié 2 nouveaux autoantigènes reconnus par des IgG à activité potentiellement acantholytique, le récepteur α9 à l'acétylcholine (Ach) (75 kDa) et la pemphaxine (ou annexine 31) (50 kDa), qui peut également se lier à l'Ach [30-33].

Les mécanismes d'action des autoanticorps au cours des pemphigus ne sont pas tous élucidés. Deux hypothèses sont couramment admises : (i) l'inhibition directe de la fonction adhésive des Dsg, probablement due au simple masquage des sites de leurs interactions par les autoanticorps [4, 26] ; (ii) l'implication de la transduction de signaux cellulaires. En effet sur des kératinocytes en culture, les anticorps de pemphigus induisent une activation du plasminogène via la transduction de signaux cellulaires et ainsi, une production de plasmine dont l'activité protéolytique conduirait à la digestion des glycoprotéines de la desmoglie [34]. Néanmoins, ces résultats demeurent controversés, et la dégradation protéolytique pourrait résulter d'un phénomène secondaire. Un autre mécanisme d'action a été proposé : la fixation des anticorps de pemphigus vulgaire à la surface des kératinocytes provoquerait la phosphorylation de la Dsg3 aboutissant à la dissociation de cette protéine et de la plakoglobine et *in fine*, à la perte d'adhésion interkératinocytaire [35]. Une première étude du transcriptome sur des kératinocytes en culture en présence d'IgG de pemphigus vulgaire montre que les anticorps diminuent la transcription de 198 gènes notamment des protéines d'adhésion desmosomales (Dsg3, périplakine, desmoplakines) et augmentent la transcription de 31 gènes dont celui de la collagénase. De plus, ces travaux ont confirmé la phosphorylation autoanticorps-dépendante de certaines molécules d'adhésion particulièrement la Dsg3 (niveau de phosphorylation augmentée de 300 p. 100) [36]. Conformément à l'hypothèse émise par Grando, l'acantholyse résulterait des effets synergiques et cumulatifs des autoanticorps reconnaissant différents antigènes de la membrane kératinocytaire incluant à la fois des molécules intervenant dans l'adhésion cellulaire (cadhérines desmosomales) et dans la régulation de cette adhésion (récepteurs à l'Ach). Enfin, de récentes données démontrent que la fixation des IgG anti-Dsg1/Dsg3 induit une cascade moléculaire aboutissant à l'apoptose kératinocytaire et *in fine*, au phénomène d'acantholyse [37, 38].

Les maladies autoimmunes sous-épidermiques

Les maladies autoimmunes sous-épidermiques constituent un groupe hétérogène d'affections de la peau et/ou des muqueuses. Elles sont caractérisées par la production d'autoanticorps pour la plupart pathogènes, dirigés contre de nombreux composants protéiques de la JDE. La fixation des anticorps à leur cible entraîne une formation de bulles sous-épidermiques. La plupart de ces maladies sont caractérisées histologiquement par un infiltrat cellulaire dense composé principalement de polynucléaires éosinophiles, neutrophiles et parfois de cellules mononucléées.

Réactivité autoanticorps

L'analyse en IFD de la peau périlésionnelle de PB, PC et d'EBA montre des dépôts linéaire d'IgG et de C3 le long de la JDE. Un dépôt linéaire exclusif d'IgA est caractéristique de la DBAL. Cet aspect de la fluorescence se distingue de celui observé au cours de la dermatite herpétiforme qui est caractérisé par des dépôts granuleux d'IgA au sommet des papilles dermiques. Les anticorps sériques de la PB, PC et d'EBA détectés par IFI sur coupe de peau humaine, se fixent le long de la JDE et appartiennent aux sous classes IgG4 et IgG1. L'utilisation de peau clivée par le NaCl 1M (qui induit la séparation de l'épiderme du derme au niveau de la *lamina lucida) (fig. 2)* permet de différencier la PB de l'EBA. En effet, la partie épidermique du clivage (ou « toit ») contient les antigènes hémidesmosomiaux (BPAG1, BPAG2, plectine et intégrine α6ß4) et le plancher dermique, la laminine 5 et les collagènes de type IV et VII. Les sérums de patients atteints de PB reconnaissent habituellement le toit du décollement (épiderme) (BPAG1 et BPAG2) tandis que les sérums de patients atteints d'EBA reconnaissent le plancher dermique du décollement (collagène VII). Les sérums de patients atteints de PC donnent habituellement une fluorescence mixte du toit et du plancher du décollement. Les sérums de patients atteints de DBAL peuvent en fonction de la spécificité des anticorps qu'ils contiennent, reconnaître soit exclusivement le toit, soit exclusivement le plancher, soit les 2 versants du décollement dermoépidermique. Les sérums de patients atteints de DH contiennent des IgA dirigées contre un tissu connectif périmusculaire, l'endomysium [39]. Ces anticorps anti-endomysium sont également présents chez les malades atteints de maladie coeliaque et reconnaissent une enzyme, la transglutaminase tissulaire [40].

Dans la PB, la majorité des autoanticorps reconnaît la partie C-terminale des antigènes BPAG1 et BPAG2. Quatre épitopes immunodominants (MCW-0 à MCW-3), groupés sur une séquence de 45 aminoacides, ont été localisés sur la portion NC16A de BPAG2 [41]. La sensibilité des tests ELISA et d'immunoempreinte utilisant comme antigène le domaine NC16A recombinant est de 95 p. 100 pour la PB [42]. Le taux des anticorps anti-NC16A semble être corrélé à l'activité de la maladie [43]. Pour la détection rapide des autoanticorps, un test ELISA utilisant l'antigène BP180-NC16A recombinant est actuellement commercialisé (MBL Medical & Biological Laboratories). Chez les malades atteints de pemphigoïde gestationis, les autoanticorps anti-NC16A (principalement IgG3 et IgG1) semblent prédominants. 10 p. 100 d'entre eux reconnaissent cependant un épitope distinct appelé MCW-5 [44]. Bien que certains sérums de PC et de DBAL réagissent

avec la région NC16A, d'autres déterminants antigéniques de la protéine peuvent également être reconnus [45, 46]. Le fragment soluble de 120 kDa de BPAG2 sécrété par les kératinocytes décrit comme l'antigène LABD-1 et son fragment protéolytique de 97 kDa (LABD97), représentent les cibles majeures des autoanticorps de la DBAL. Au cours de cette dermatose, les IgA réagissent préférentiellement avec le domaine Coll. 15 de la forme soluble LABD-1 [47]. Néanmoins, la réponse autoanticorps est hétérogène, et peut selon les cas être dirigée à la fois contre des antigènes dermiques et épidermiques ce qui explique les différents aspects qui peuvent être observés en immunomicroscopie électronique ou en immunofluorescence sur peau clivée par le NaCl [48]. Les données sur la cartographie épitopique de BPAG1 sont encore parcellaires et montrent une reconnaissance de multiples déterminants antigéniques localisés dans les sous domaines B et C de l'extrémité C-terminale de BPAG1 par les sérums de PB [49]. A côté des anticorps de sous classes IgG1 et IgG4, des anticorps d'isotype IgE dirigés contre BPAG1 et BPAG2 ont également été décrits dans le sérum des malades atteints de PB [50, 51]. Dans la PC, les anticorps anti-laminine 5 reconnaissent de façon prédominante la sous unité α3 de la protéine et réagissent par réactivité croisée avec la laminine 6 qui possède la même sous unité α3 [52]. L'étude de la cartographie épitopique de l'intégrine α6ß4 montre que les autoanticorps de malades atteints de PC sont dirigés principalement contre le domaine intracellulaire de la sous-unité ß4 [53]. Au cours de l'EBA, 4 épitopes majeurs ont été localisés sur le domaine NC1 du collagène VII [54]. La détection rapide de ces autoanticorps a été réalisée par un test ELISA utilisant comme antigène le domaine NC1 recombinant [55]. Pourtant, le spectre de réactivité autoanticorps contre le collagène VII semble hétérogène puisque de récentes données ont montré d'autres déterminants antigéniques reconnus par les autoanticorps : (i) la triple hélice du domaine central de la protéine est reconnue par un sous groupe de patients [56], (ii) la région NC2/COL, impliquée dans le processus de dimérisation des molécules de collagène VII [57]. Enfin, la spécificité des anticorps de la DH a été récemment précisée et correspondrait à la transglutaminase épidermique (TGase 3) [58]. L'enzyme TGase 3 est exprimée de façon prédominante dans les couches supérieures de l'épiderme. Elle participe à la formation de l'enveloppe cornée durant la différenciation kératinocytaire en favorisant le pontage (intramoléculaire) de certaines protéines épidermiques [59].

Pathogénicité et modes d'action des autoanticorps

Plusieurs travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont établi la pathogénicité des autoanticorps anti-membrane basale. Les preuves directes les plus probantes de la pathogénicité des anticorps dirigés contre l'autoantigène BPAG2 ont été fournies par Liu *et al.* dans un modèle expérimental murin de PB. Le transfert passif d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine BPAG2 humaine à des souris BALB/c nouveau-nées induit des lésions cliniques, histologiques et immunologiques similaires à celles de la PB humaine [60]. Dans ce modèle expérimental, les autoanticorps pathogènes réagissent contre un déterminant de BPAG2 murine homologue au domaine NC16A de la protéine humaine [61]. L'activation du complément et le recrutement des polynucléaires neutrophiles à la membrane basale sont nécessaires au déclenchement de la maladie [62, 63]. De plus, les protéases sécrétées par les neutrophiles activités (élastase et gélatinase B), participent de façon critique aux lésions tissulaires initiées par la fixation des anticorps anti-BPAG2 à leur cible [64, 65]. Dans ce modèle expérimental murin de PB, des données récentes suggèrent l'implication des mastocytes et des macrophages dans le recrutement des neutrophiles. La collaboration des macrophages, des mastocytes et des neutrophiles semble nécessaire pour l'induction de la maladie chez la souris [66, 67]. Par contre, aucun travail n'a pu montrer le rôle pathogène des anticorps anti-BPAG1 dans la PB. Le rôle pathogène des IgA au cours de la DBAL a été récemment montré dans un modèle murin de transfert passif. En effet, l'injection d'IgA anti-LABD97 à des souris SCID porteuses d'un greffon de peau humaine aboutit dans un tiers des cas à une séparation de la membrane basale accompagnée d'un infiltrat de neutrophiles dans les papilles dermiques [68]. Au cours de la PC, la pathogénicité des autoanticorps dirigés contre laminine 5 a été démontrée, (i) par transfert passif d'anticorps anti-laminine 5 de lapin purifiés à des souris BALB/c nouveaux-nés [69], (ii) par transfert à des souris SCID adultes porteuses d'un greffon de peau humaine, d'IgG purifiées de patients atteints de PC et dirigées contre la sous-unité α de la laminine 5 [70]. Dans ces deux modèles, les souris receveuses présentent une maladie similaire à la maladie humaine. Des arguments en faveur de la pathogénicité des anticorps anti-intégrine α6ß4 ont été apportés par des études *in vitro*, dans lesquelles l'incubation de culture de conjonctive oculaire ou de muqueuse buccale avec des IgG anti-intégrine α6ß4 purifiées à partir du sérum de malades atteints de PC aboutit à une séparation de la membrane basale [71, 72]. La pathogénicité des autoanticorps anti-collagène VII n'est pas formellement démontrée cependant, l'incubation de cryosections de peau humaine avec des leucocytes de sujets sains et les sérums de patients atteints d'EBA conduit à une séparation dermoépidermique dépendante de l'activation des polynucléaires neutrophiles [73].

Les mécanismes d'action des anticorps anti-membrane basale ne sont pas élucidés. Différentes hypothèses ont été évoquées : (i) interférence dans l'association des molécules de la JDE due à la fixation des autoanticorps, (ii) activation du complément, (ii) sécrétion par les éosinophiles de médiateurs de l'inflammation via les anticorps IgE anti-BPAG1-2, (iii) sécrétion par les polynucléaires neutrophiles, les macrophages ou les kératinocytes de protéases susceptibles de dégrader la matrice extracellulaire de la JDE [74].

Conclusion

Les maladies bulleuses autoimmunes doivent être considérées comme résultant d'une rupture large de la tolérance vis-

à-vis d'un ou de plusieurs antigènes desmosomaux ou de la jonction dermoépidermique. Elles représentent des modèles de maladies autoimmunes spécifiques d'organe médiées par des autoanticorps pathogènes. La reconnaissance de leurs mécanismes physiopathologiques au niveau moléculaire et cellulaire a permis une meilleure compréhension des processus d'autoimmunisation, a largement contribué à la compréhension des fonctions adhésives de la peau et permet d'espérer de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Références

1. Amagai M. Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. J Invest Dermatol 1995;104:146-52.

2. Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. J Dermatol Sci 1999;20:92-102.

3. Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG et al. Desmoglein 4 in hair follicle differenciation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. Cell 2003;113:249-60.

4. Martel P, Joly P. Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. Clin Dermatol 2001;19:662-74.

5. Kazerounian S, Mahoney M G, Uitto J, Aho S. Envoplakin and periplakin, the paraneoplastic pemphigus antigens, are also recognized by pemphigus foliaceus autoantibodies. J Invest Dermatol 2000;115:505-7.

6. Nagata Y, Karashima T, Watt FM, Salmhofer W, Kanzaki T, Hashimoto T. Paraneoplastic pemphigus sera react strongly with multiple epitopes on the various regions of envoplakin and periplakin, except for C-terminal homologous domain of periplakin. J Invest Dermatol 2001; 116:556-67.

7. Cozzani E, Cacciapuoti M, Parodi A. Adhesion molecules in keratinocyte. Clin Dermatol 2001;19:538-43.

8. Leung CL, Green KJ, Liem RK. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. Trends Cell Biol 2002;12:37-45.

9. Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. J Invest Dermatol 1999; 112:411-8.

10. Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, Uitto J. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. Clin Dermatol 2001;19:551-62.

11. Hirako Y, Nishizawa Y, Sitaru C, Opitz A, Marcus K, Meyer HE et al. 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 2003;121:1554-6.

12. Amagai M, Ishii K, Hashimoto T, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. Conformational epitopes of pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) are calcium dependant and glycosylation independant. J Invest Dermatol 1995;105:243-7.

13. Emery DJ, Diaz LA, Fairley JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ. Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein 1. J Invest Dermatol 1995;104:323-8.

14. Ortiz-Urda S, Elbe-Burger A, Smolle J, Marquart Y, Chudnovsky Y, Ridky TW et al. The plant lectin wheat germ agglutinin inhibits the binding of pemphigus foliaceus autoantibodies to desmoglein 1 in a majority of patients and prevents pathomechanisms of pemphigus foliaceus *in vitro* and *in vivo*. J Immunol 2003;171:6244-50.

15. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. J Immunol 2001;167: 5439-48.

16. Li N, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Exp Med 2003;197:1501-10.

17. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, et al. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. Br J Dermatol 1999;140:351-357.

18. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. J Immunol 1997;159:2010-7.

19. Cheng SW, Kobayashi M, Kinoshita-Kuroda K, Tanikawa A, Amagai M et al. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. Br J Dermatol 2002;147:261-5.

20. Amagai M, Nishikawa T, Nousari HC, Anhalt GJ, Hashimoto T. Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis *in vivo* in neonatal mice. J Clin Invest 1998;102:775-82.

21. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfert of IgG from patients with the disease. N Engl J Med 1982;306:1189-96.

22. Fan JL, Memar O, McCormick DJ, Prabhakar BS. BALB/c mice produce blister-causing antibodies upon immunization with a recombinant human desmoglein 3. J Immunol 1999;163:6628-35.

23. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J Clin Invest 2000;105:625-31.

24. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Hata J et al. Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol 2002;118:199-204.

25. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T et al. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. Eur J Immunol 2002;32:627-33.

26. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T et al. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J Immunol 2003;170:2170-8.

27. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profiles. J Am Acad Dermatol 1999;40:167-70.

28. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J Clin Invest 1999;103:461-8.

29. Wu H, Wang ZH, Yan A, Lyle S, Fakharzadeh S, Wahl JK et al. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. N Engl J Med 2000;343:31-5.

30. Vu TN, Lee TX, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Dahl MV et al. The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Arch Dermatol 1998;134:971-80.

31. Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. Am J Pathol 2000;157:1377-91.

32. Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. J Biol Chem 2000;275:29466-76.

33. Nguyen VT, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA. Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. J Clin Invest 2000;106:1467-79.

34. Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. J Invest Dermatol Symp Proc 1999;4:137-44.

35. Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y. A pathogenic autoantibodies, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. Eur J Immunol 1999;29:2233-40.

36. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grando SA. Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. J Biol Chem 2004;279:2135-46.

37. Wang X, Bregegere F, Frusic-Zlotkin M, Feinmesser M, Michel B, Milner Y. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. Apoptosis 2004; 9: 131-43.

38. Pelacho B, Natal C, Espana A, Sanchez-Carpintero I, Iraburu MJ, Lopez-Zabalza MJ. Pemphigus vulgaris autoantibodies induce apoptosis in HaCaT keratinocytes. FEBS Lett 2004;566:6-10.

39. Kanitakis J. Indirect immunofluorescence microscopy for the serological diagnostics of autoimmune blistering skin diseases: a review. Clin Dermatol 2001;19:614-21.

40. Reunala TL. Dermatitis herpetiformis. Clin Dermatol 2001;19:728-36.

41. Zillikens D, Rose PR, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA et al. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. J Invest Dermatol 1997;109:573-9.

42. Nakatani C, Muramatsu T, Shirai T. Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins. Br J Dermatol 1998;139:365-70.

43. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16A protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. J Dermatol Sci 2002;30:224-32.

44. Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Dopp R, Giudice GJ, Brocker EB et al. IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within BP180 NC16A in pemphigoid gestationis. J Invest Dermatol 1999;113:140-2.

45. Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D et al. Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. J Invest Dermatol 1996;106:41-6.

46. Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H et al. Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. J Invest Dermatol 1999;113:947-53.

47. Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D et al. The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. Am J Pathol 2000;156:685-95.

48. 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 2003;149:977-85.

49. Skaria M, Jaunin F, Hunziker T, Riou S, Schumann H, Bruckner-Tuderman L et al. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230. J Invest Dermatol 2000;114:998-1004.

50. Delaporte E, Dubost-Brama A, Ghohestani R, Nicolas JF, Neyrink JL, Bergoend H et al. IgE autoantibodies directed against the major bullous pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. J Immunol 1996;157:3642-7.

51. Dimson OG, Giudice GJ, Fu CL, Van den Bergh F, Warren SJ, Janson MM et al. Identification of a potentiel effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. J Invest Dermatol 2003;120:784-8.

52. Lazarova Z, Hsu R, Yee C, Yancey KB. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid represents an autoimmune response to subunits present in laminin 5 (*a3ß3g2*). Br J Dermatol 1998;139:791-7.

53. Bhol KC, Dans MJ, Simmons RK, Foster CS, Giancotti FG, Ahmed AR. The autoantibodies to alpha 6 beta 4 integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmic domain of human beta 4. J Immunol 2000;165:2824-9.

54. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM et al. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. J Clin Invest 1993;92:1831-9.

55. Chen M, Chan LS, Cai X, O'Toole EA, Sample JC, Woodley DT. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. J Invest Dermatol 1997;108: 68-72.

56. Tanaka H, Yamamoto AI, Hashimoto T, Hiramoto K, Harada T, Kawachi Y et al. A novel variant of acquired epidermolysis bullosa with autoantibodies against the central triple-helical domain of type VII collagen. Lab Invest 1997;77:623-32.

57. Chen M, Keene DR, Costa FK, Tahk SH, Woodley DT. The carboxyl terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation and constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis bullosa acquisita autoantibodies. J Biol Chem 2001;276:21649-55.

58. Sardy M, Karpati S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. J Exp Med 2002;195:747-57.

59. Hitomi K, Presland RB, Nakayama T, Fleckman P, Dale BA, Maki M. Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. J Dermatol Sci 2003;32:95-103.

60. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. J Clin Invest 1993:92;2480-8.

61. Liu Z, Diaz LA, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, Giudice GJ. Molecular mapping of a pathogenically relevant BP180 epitope associated with experimentally induced murine bullous pemphigoid. J Immunol 1995;155: 5449-54.

62. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL et al. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 1995;95:1539-44.

63. Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA et al. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 1997;100:1256-63.

64. Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z et al. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. J Exp Med 1998;188:475-82.

65. Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ et al. A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 2000;105:113-23.

66. Chen R, Ning G, Zhao M-L, Fleming MG, Diaz LA, Werb Z et al. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 2001;108:1151-58.

67. Chen R, Fairley JA, Zhao M-L, Giudice GJ, Zillikens D, Diaz LA et al. Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-me-

diated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. J Immunol 2002;169:3987-92.

68. Zone JJ, Egan CA, Taylor TB, Meyer LJ. IgA autoimmune disorders: development of a passive transfer mouse model. J Investig Dermatol Symp Proc 2004;9:47-51.

69. Lazarova Z, Yee C, Darling T, Briggaman RA, Yancey KB. Passive transfert of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. J Clin Invest 1996;98:1509-18.

70. Lazarova Z, Hsu R, Yee C, Yancey KB. Human anti-laminin 5 autoantibodies induce subepidermal blisters in an experimental human skin graft model. J Invest Dermatol 2000;114:178-84.

71. 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 2003;120:701-2.

72. Chan RY, Bhol K, Tesavibul N, Letko E, Simmons RK, Foster CS et al. The role of antibody to human beta4 integrin in conjunctival basement membrane separation: possible *in vitro* model for ocular cicatricial pemphigoid. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:2283-90.

73. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brocker EB, Zilligens D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcgamma-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. Am J Pathol 2002;161:301-11.

74. Ghohestani RF. Pathogenic effects of auto-antibodies in skin diseases. In: JF Nicolas, J Thivolet, eds. Immunodermatology. Paris:John Libbey Eurotext,1998:185-200.

Question du praticien

La rubrique « Question du praticien » n'est plus annoncée dans chaque numéro des *Annales de Dermatologie*.

Le Comité de Rédaction et nos interlocuteurs du Comité de Lecture restent à votre disposition pour répondre à vos questions. Celles d'intérêt général seront publiées dans notre revue.

Les « Questions » sont à adresser, en 2 exemplaires, sur papier libre ou papier à entête au Comité de Rédaction, Annales de Dermatologie et de Vénéréologie, Masson, MediMedia France, 21, rue Camille Desmoulins, 92789 Issy-les-Moulineaux Cedex 9.

ELSEVIER

Journal of Autoimmunity 24 (2005) 319–328

journal of autoimmunity

www.elsevier.com/locate/issn/08968411

Genetic factors in pemphigus

François Tron [a,*], Danièle Gilbert [a], Hugo Mouquet [a], Pascal Joly [a], Laurent Drouot [a], Sondès Makni [b], Hatem Masmoudi [c], Dominique Charron [d,e], Mondher Zitouni [b], Pascale Loiseau [d], Mourad Ben Ayed [c]

[a] *Unité INSERM 519 – IFRMP 23, Hôpital Charles Nicolle, Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie, 22, Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France*

[b] *Laboratoire d'Immunologie, CHU Habib Bourguiba, 3029 Sfax, Tunisie*

[c] *Laboratoire d'Immunologie, Hôpital La Rabta, Jabbari – 1007 Tunis, Tunisie*

[d] *Service d'Immunologie, Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10*

[e] *INSERM, U396, IFR 58*

Received 22 November 2004; revised 23 February 2005; accepted 15 March 2005

Abstract

Epidemiological studies performed in different ethnic populations and family studies, notably based on a partial phenotype of the autoimmune process, indicate that genetic factors are involved in the occurrence of pemphigus. However, the precise heritability remains uncertain in the absence of twin concordance rate studies. Among the different strategies available to identify genetic factors participating in autoimmune disease susceptibility, only population studies based on case–control design have been performed in pemphigus. These studies consistently showed that MHC locus, in particular HLA class II alleles, are associated with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Other genes of the MHC locus may also participate in disease susceptibility as shown by studies using microsatellite markers across different regions of the MHC. It is likely that other non-MHC genes are involved in the pathogenesis of pemphigus. In particular, involvement of a polymorphic variant of desmoglein 1 gene was shown to be associated with pemphigus foliaceus and to interact in an epistatic manner with MHC class II genes to contribute to the autoimmune process. Other candidate genes to which a role can be assigned in the disease pathogenesis should be considered to design case–control or family-based association studies. Genome scan studies which require a large number of multiplex families to reach statistical power, should also be considered in the endemic form of pemphigus foliaceus because of the high number of familial cases.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pemphigus; HLA; Autoantigen; Desmoglein

1. Introduction

Pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF) are rare but informative organ-specific autoimmune diseases. In most autoimmune diseases, several factors, genetic, environmental and stochastic, contribute to their susceptibility. In pemphigus, a large body of data has accumulated which supports genetic predisposition as a contributor. This review will summarize data demonstrating the participation of genetic factors in the occurrence of pemphigus and the strategies developed for their identification. Some of these strategies are based on what is known of the biology of pemphigus which, thus, will constitute the first part of this review.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 32 88 80 71; fax: +33 2 32 88 81 86.

E-mail address: francois.tron@chu-rouen.fr (F. Tron).

0896-8411/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jaut.2005.03.006

2. Biology of pemphigus

Pemphigus are characterized by the production of autoantibodies directed against desmogleins (Dsg), Dsg3 in PV and Dsg1 in PF, that are keratinocyte transmembrane proteins localized in the desmosome and members of Ca+-dependent adhesion molecules, the cadherins [1]. The pathogenic property of anti-desmoglein autoantibodies can be directly demonstrated by passive transfer experiments: immunoglobulins G (IgG) purified from patient sera during the active phase of the disease induce keratinocyte-cell membrane Ig deposit and blister formation when injected intra-peritoneally into normal mice [2,3]; newborns to mothers with PV may develop a transient form of the disease due to the maternal IgG autoantibodies that cross the placenta [4]. The interaction of anti-Dsg antibodies (Ab) with their target antigens (Ag) is responsible for the loss of cell adhesion (acantholysis) and the formation of intra-epithelial blisters of the skin and mucous membranes. Immunochemical analysis of autoantibodies directed against desmogleins indicates that they predominantly but not exclusively bind to the extracellular domains of the proteins [5,6] and exert their pathogenic effect through the inhibition of their adhesive properties. Anti-Dsg antibodies belong to IgG1 κ, λ and IgG4 κ, λ subclasses [7]. Interestingly, IgG4 are produced during active phase of the disease, are absent in patients in remission [8], and are considered to display most of pathogenic properties. In contrast, no data are available about the structural characteristics of anti-Dsg Ab. The difficulty to derive pathogenic anti-Dsg Ab producing hybridomas or EBV-cell lines from peripheral blood lymphocytes (PBL) of pemphigus patients [9], likely due to technical limitation and/or the small number of specific B-cell precursors in PBL, did not allow to study anti-Dsg1 or Dsg3 autoantibodies at the clonal level and, in particular, to analyze the repertoire of V_H and V_L genes they utilize. Therefore, it is still questionable whether anti-Dsg Ab use recurrent V_H and V_L gene segments, are encoded by germline or somatically-mutated genes, all questions that are directly relevant to the mechanisms of autoantibody production and B-cell activation. Results from such analysis might also incite to study the contribution of Ig polymorphism, in particular of Ig heavy chain (*IGHV*) and light chain variable (*IGLV*) loci, to disease susceptibility if, for example, V_H and/or V_L genes of a given family or a particular V gene were shown to be used recurrently to construct an anti-Dsg Ab response.

T-cells intervene in the generation of the lesional mechanisms indirectly. Indeed, the production of IgG4 autoantibodies during active phase of pemphigus suggests the participation of mechanisms operating at not only the B- (switch of Ig classes and subclasses) but also the T-cell level such as the production of interleukins 4 (IL-4) and 13 (IL-13) which promote and are secreted by Th2-type T-cells. In addition, as in all organ-specific autoimmune diseases, the tolerance breakage to target autoantigens are thought, although not exclusively, to take place at the T-cell level, i.e., at the immunological synapse involving human leucocyte antigens (HLA) class II molecules, the initiating auto-antigenic peptide(s) and T-cell receptors (TCR). Characterization of autoreactive T-cells and, more particularly, dissection of T-cell epitopes of Dsg3 and Dsg1 are underway in several laboratories [10–17] as well as the identification of HLA class II alleles that restrict Dsg-specific T-cell responses. Recent studies have identified immunodominant T-cell epitopes and started characterizing the repertoire of Dsg3- or Dsg1-specific T-cells at the clonal level [16,18]. Therefore, the genes coding for the 3 major molecules of the immunological synapse i.e., TCR, major histocompatibility complex (MHC) and autoantigen should also be considered as candidate genes conferring susceptibility.

Other components of the desmosome can be targeted by the pemphigus autoimmune response. In PV and PF, proteins of the desmosome plaque such as desmoplakin [19] envoplakin and periplakin [20], can be bound by autoantibodies. In paraneoplastic pemphigus (PNP), a rare form of pemphigus associated with lymphoproliferative disorders, the B-cell autoimmune response is directed against various components of cell adhesion structures [21], namely proteins of the plakin family among which envoplakin and periplakin are constantly bound by autoantibodies. Whether this type of pemphigus is triggered by genetic factor(s) similar to those identified in PV and PF remains to be determined.

Animal models of autoimmune diseases are of major interest to study genetic mechanisms responsible for the initiation and the development of autoimmune responses. Spontaneous models of organ-specific autoimmune diseases, such as the non-obese diabetic (NOD) mouse strain and the Biobreeding (BB) rat for human type 1 diabetes and the obese strain (OS) of chicken for thyroiditis, have provided invaluable information about the immunological and genetic factors contributing to the occurrence and expression of the disease. However, although pemphigus has been described in certain animal species such as dog and cat, there is no available spontaneous model which could be a guidelight for the human diseases. Experimental organ-specific autoimmune diseases induced by immunization with an "heterologous autoantigen" also constitute useful models of human diseases that were shown to be governed by genetic factors [22]. Unfortunately, attempts to induce experimental pemphigus diseases by immunizing normal mice with recombinant Dsg1 and Dsg3 have failed, apparently due to the inability to induce tolerance breakage to these peripheral autoantigens. Recently, an elegant model of blistering autoimmune disease, based

on the transfer to severe combined immune deficiency (SCID) mice of B- and T-cells derived from Dsg3 $^{-}/^{-}$ knock-out mice immunized with mouse Dsg3, may help unveil cellular and molecular mechanisms at work in this organ-specific autoimmune disease [23]. However, the characteristics of the model, i.e., immunization of knock-out mice for the triggering "autoantigen", limit the analysis of the initiating events and genetic factors responsible for the breakage of B- and T-cell tolerance.

Another feature, probably unique to certain forms of pemphigus, is the role of environmental factors in the occurrence of the disease. Indeed, while PV and non-endemic forms of PF occur sporadically throughout the world, an endemic form of PF is observed in certain geographical areas, namely Brazil [24], Colombia [25] and Tunisia [26]. In Brazil, epidemiological studies suggest that PF (fogo selvagem) is triggered by environmental factors [27] and provides a unique opportunity to study the interplay between environmental and genetic factors in the development of an organ-specific autoimmune disease. Drug-induced pemphigus also emphasizes the role of inducing or triggering exogenous agents in the development of the disease [28].

3. Genetic epidemiology

For a given autoimmune disease, clues to the underlying genetic susceptibility should be provided by epidemiological studies, including differences in the autoimmune disease prevalence in different populations, familial aggregation and risks to specific type of relatives, twin and adoption studies, before undertaking identification of the susceptibility genes. In pemphigus, several data are available from genetic epidemiology studies indicating that susceptibility to the disease is inherited.

3.1. Population prevalence

The prevalence and incidence of pemphigus are low. The annual incidence of the disease has been calculated in various populations and differs among ethnic groups. For example, the incidence is higher in Jewish population, in particular of Ashkenazi origin [29], in Japanese [30] and in Indian [31] as compared to the incidence observed in North America or Western Europe [32]. However, those differences may be due to environmental factors, emphasizing the value of incidence or prevalence studies performed in different ethnic groups living in the same environment or in the same ethnic group living in different environments. An example of the former is the difference in the annual incidence of pemphigus, estimated in Hartford County (USA), from 1972 to 1977, between the overall adult population (4.2 cases per 100,000) and the Jewish adults (32 cases per 100,000) [33]. An example of the latter is the similar prevalence of PV in Indians living in South Africa and in their land of origin [34].

Examination of epidemiological studies attempting to evaluate the incidence of pemphigus in various populations strongly suggests that the incidence is higher in the lower latitudes and lower in the higher latitudes. For example, the annual incidence was 0.76 case per million inhabitants in Finland [35], 1.7 cases in France [26], 3 in Italy [36] and 6.7 in Tunisia [26]. This North–South gradient, if confirmed, is the opposite to that observed for other 2 organ-specific autoimmune diseases, multiple sclerosis (MS) and type 1 diabetes whose prevalence is higher in higher latitudes. This observation indeed, may be due to environmental factors, in particular, the socioeconomic status, but alternatively to genetic factors. In this regard, it is interesting to consider that MS and type 1 diabetes are thought to be Th1-dependent autoimmune diseases and pemphigus Th2-organ-specific autoimmune diseases occurring in different geographical areas where the major selective pressure was exerted by different pathogenic agents, *mycobacterium tuberculosis* (a Th1 pathogen) in the North of Europe and malaria (a Th2 pathogen) in the South of Europe and North Africa.

3.2. Familial aggregation

Familial cases of pemphigus have been reported. In PV, they are very unusual and only sporadic cases involving first-degree relatives, mainly parent–child and/or sibling–sibling have been described [37–40]. However, 2 different observations speak for the involvement of genetic factors in PV susceptibility: (i) a significant increase in the prevalence of autoimmune diseases in the first-degree family members of PV patients compared with relatives of healthy controls, which allows to suspect that genetic factors governing the occurrence of general autoimmunity participate in PV susceptibility [41]; (ii) anti-Dsg3 antibodies, a partial phenotype of the autoimmune process, were frequently detected ($>50\%$) in asymptomatic parents of PV patients in a pattern consistent with a dominant inheritance [42,43]. In PF, in particular the endemic form observed in Brazil (FS), multiple cases of PF in family units have been reported and anti-Dsg1 Ab can be detected at a high frequency in patient's relatives [44]. In contrast, familial cases of the endemic form of the Tunisian PF seem to be rare. Whether anti-Dsg1 autoAb are present in family members of patients with sporadic or endemic Tunisian PF remains to be determined and is currently under study.

3.3. Twin and adoption studies

Twin studies allow to estimate and compare the risk for developing pemphigus in monozygotic and dizygotic twins when a member of a pair is involved by the disease (concordance rates). Unfortunately, in pemphigus, neither twin nor adoption studies, which required very large population-based ascertainment, have been reported due in part to the low prevalence of pemphigus.

Finally, population prevalence and family studies, in particular based on the anti-Dsg partial phenotype, allow to consider that genetic plays a role in the occurrence of both PV and PF and suggest a dominant inheritance of the autoantibody response.

4. Strategy to identify genetic factors in pemphigus

Several approaches are available to identify the genes participating in autoimmune disease susceptibility. The candidate gene strategy aims at testing genes coding for a molecule thought to play a role in immune dysregulation leading to the autoimmune process (target antigens, antigen-processing or presenting molecules [45], B- and T-cell antigen receptors, cytokines and molecules participating in B–T-cell cooperation [46]) and may itself use different approaches. Population studies, in particular case–control studies, allow to test an association between a given risk factor and a disease and is based on the comparison of affected and unaffected subjects. Family-based association studies may use gene linkage analysis which is based on the analysis of the segregation of 2 traits, disease and susceptibility genes, in families with multiple affected individuals [47]. A powerful family-based association study is the transmission disequilibrium test (TDT) which requires the use of affected individuals and of both parents [48]. However, this method may be difficult to apply to pemphigus since, at least for PV and the sporadic form of PF, the disease mainly affects individuals >50 years and many patients will not have both parents alive. The aim of genomic-wide scans is to identify cosegregation of polymorphic markers and disease (or partial phenotype) to define chromosomal regions containing susceptibility loci. Genomic-wide linkage uses microsatellite markers and requires large multiple families of affected individuals The problems that geneticists faced to map genes involved in autoimmune diseases illustrate the difficulty of this approach [49,50]. The rarity of familial cases in most types of pemphigus may make genome-wide linkage study not applicable although the endemic form of PF occurring in Brazil may constitute an appropriate population.

5. Identification of genes involved in pemphigus

So far, the unique approach used to identify genes participating in pemphigus susceptibility has been population studies based on case–control design that tested a few genes thought to play a role in the disease. This approach consistently demonstrated that the MHC locus is associated with both PV and PF. Recent studies conducted in our laboratory also suggest that *DSG1* gene participates in PF susceptibility and interacts with MHC genes to increase the risk to develop this autoimmune disorder. Other candidate gene studies, either gave negative or inconsistent results.

5.1. MHC genes

The MHC locus is an important susceptibility locus for most autoimmune diseases as shown by association studies and, more recently, genome scan analysis in MS [51] and type 1 diabetes [52]. The association of PV with HLA class II alleles was revealed as early as 1980 and was repeatedly demonstrated by serological, restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and genotype analyses. A compilation of various studies performed in different ethnic populations is presented in Table 1. The demonstration of the association of PF with HLA class II alleles was provided more recently and involved both the endemic and non-endemic forms of the disease (Table 2). Several interesting observations can be made from these studies. PV was consistently found to be associated with DR4 and DR14 and, more precisely, with DRB1*0402 and DRB1*1401 subtypes. For example, DRB1*0402 was found in 92% of Ashkenazi Jews [53], 85% of non-Jewish Iranians [66], 81% of Sardinians [58], 33% of Italians [57] while its prevalence in these different normal populations ranged from 2 to 4%; HLA DRB1*1401 was found in 44.2% of Italian [57], 44% of Japanese [64], 37% in Pakistani [59] and 28% of Spanish [60] patients. Thus, 2 different susceptibility alleles are associated with PV patients of different ethnic groups. Most DRB1*04 individuals are DQB1*0302 and most DRB1*14 are DQB1*0503 due to linkage disequilibrium. Since DRβ1 alleles other than DRB1*0402 and DRB1*1401 and linked to DQB1*0302 and 0503 are not increased in PV, one can hypothesize that the primary association is with DRB1 genes. This presumption is supported by most functional studies showing that Dsg3-specific T-cell lines were restricted to DR [67]. However, the association of PV with DQB1*0503 was reported to be primary in one study [68] and in vitro, monoclonal antibodies anti-HLA DR but also anti-HLA DQ were shown to abolish anti-Dsg3 antibody production by B-cells cocultured with CD4+ T-cells obtained from patients with PV [69]. It is also interesting to note that DRB1*0402 which predisposes

Table 1
MHC genes identified by association studies in PV

Populations	n		Alleles	References
	Controls	Patients		
Caucasians				
Ashkenazi Jews		26	DR4, DQw8	[53]
French	106	37	DRB1*0402, 1401; DQB1*0302; 0503	[54]
Indians	89	37	DRB1*1404; DRB1*0202; DQA1*0101; DQB1*0503	[55]
Italians	128	61	DRB1*0402, DRB1*1401; DQB1*0503	[56,57]
Sardinians	–	16	DRB1*0402; DQA1*0301; DQB1*0302	[58]
Pakistani	–	19	DRB1*1404; DQA1*0101; DQB1*0503	[59]
Spanish	200	26	DRB1*0402, 1401; DQB1*0503, 0302	[60]
US	44	38	DR4	[61–63]
Mongoloids				
Japanese	525	55	DRB1*0403, 0406; DRB1*1401, 1405, 1406	[64,65]

to idiopathic PV has been reported in patients affected by the drug-triggered form of the disease [70].

Susceptibility to PF has been correlated with the presence of DR4, DR14 and DR1 alleles (Table 2). However, in contrast to PV, no single DR4 or DR14 allele was shown to be associated with the disease. Indeed, DRB1*0403, *0404, DRB1*0406 and DRB1*0402 in certain studies [54,64,72,76] and DRB1*1401, 1402, 1406 and DRB1*0102 subtypes were increased in PF patients. These studies also showed that endemic and non-endemic forms of PF share similar alleles of susceptibility, an observation which, along that made in spontaneous and drug-triggered PV, indicates that different environmental factors interact with common genetic background to increase the risk to develop these autoimmune blistering skin diseases.

Analysis of MHC class II molecules in autoimmune diseases such as type 1 diabetes, showed that certain alleles may confer protection [77]. Results obtained from studies performed in PV and PF also suggest that certain HLA protective alleles are present in the HLA class II regions, such as DRB1*13 and DRB1*07 in Spanish [60] and Italian [57] PV patients, respectively. The recent study performed by the group of Petzl-Erler in large populations of Brazilian patients with endemic PF and healthy controls provided interesting observations about the role of allelic interactions on disease susceptibility/resistance [71]. Previously reported positive associations with HLA-DR antigens were confirmed (see Table 2) and several HLA-DR antigens (DRB1*0301,*0701, *0801, *1101, *1104 and *1402) were negatively associated with PF. Susceptible alleles were shown to be semi-dominant over neutral alleles, and protective alleles semi-dominant over susceptible and dominant over neutral. This study emphasizes the crucial role of HLA-DRB1 gene in modulating susceptibility to and protection against PF.

MHC class II locus was also found associated with the third variety of pemphigus, PNP. Interestingly, in the unique series that we reported, the MHC class II alleles, DR4 and DR14, regularly found associated with PV and PF, were not increased in these patients, while the DR3 allele was significantly increased [78]. This observation, if confirmed in larger series of patients with PNP, would indicate that PNP has a genetic basis different from PV and PF.

MHC outside the HLA class II region may also contribute to disease susceptibility. In the study

Table 2
MHC genes identified by association studies in PF

Populations	n		Alleles	References
	Controls	Patients		
Sporadic PF				
French	106	20	DRB1*0404 ; DRB1*0102	[54]
Italians	128	26	DRB1*04 ; DRB1*1404 ; DQB1*0503	[57]
Japanese	525	7	DRB1*04 ; DRB1*0403, *0406; DRB1*14; DRB1*1401, *1405, *1406	[64]
Endemic PF				
Brazilians	182	147	DRB1*0102, *0404, *0406 ; DRB1*1406, *1602	[71,72]
	50	38	DRB1*0102	[73–75]
Tunisians	100	28	DR4	(UO)

UO: unpublished observation.

performed in Spanish PV patients, HLA B38 was found to be significantly increased with a frequency of 23% versus 7% in the general population [60]. More recently, microsatellite probes that span the entire MHC region were used to screen DNA samples from 38 Jewish PV patients and 76 healthy controls. While some markers were associated with MHC class II region, 4 probes mapped to MHC class I region [79]. Further analysis of these DNA samples with 26 single nucleotide polymorphism markers spanning a chromosomal region of 600,000 bp, indicated that 4 markers were found informative and all mapped to HLA-G. A deletion/insertion variant in exon 8 of the gene was found associated with the disease [80].

Although one cannot exclude that genes in strong linkage disequilibrium with HLA class II genes participate in pemphigus susceptibility. The major mechanism proposed to explain the association between MHC genes and autoimmune diseases is that disease-associated alleles can efficiently accommodate an autoantigen-derived peptide initiating the autoreactive T-cell response. The peptide binding groove of the HLA class II molecules contains pockets, five of them P1, P4, P6, P7 and P9 interact with amino acids of the side chains of the bound peptide. Polymorphism of HLA class II molecules involves amino acid residues that contribute to the shape and charge of the pocket. PV-linked DRB1*0402 differs from other DR4 subtypes by the presence in the P4 pocket of 2 negatively-charged residues at position 70 (D) and 71(E) and, thus, could selectively present a Dsg3-derived peptide. Data obtained from Wuscherpfennig et al. [81] strongly support this model, since, based on the binding motif of DRB1*0402 molecule, several candidate peptides of Dsg3 were selected, one of which induced consistently proliferation of T-cells from DRB1*0402 positive PV patients. However, DRB1*0401 which is also associated with PV does not share the anionic amino acids of the DRB1*0402 molecule suggesting that different peptides may participate in the initiation of autoimmune response or that other part(s) of the HLA-DRB1 chain contribute to disease susceptibility. Similar conclusion was reached in PF patients by Pavoni et al. [72] who could not identify, among HLA-DRB1 alleles predisposing to Brazilian endemic PF, any simple shared polypeptide motif at positions 67–74 although the clustering of DRB alleles in functional groups based on the properties of polymorphic residues at position 70, 71, 74 and 86, resulted in a better discrimination among susceptibility and protective alleles. Further studies are needed using different approaches such as T-cell proliferation assays, generation of T-cell lines and clones, binding experiments of candidate peptides to purified HLA Class II molecules and identification of peptides eluted from these molecules to precisely define immunodominant epitopes initiating the autoimmune process, which may help design new therapeutic strategies.

5.2. Autoantigen genes

It is actually firmly established that autoantigens initiate and drive autoimmune responses both at the B- and T-cell level. Experimental models of autoimmune diseases induced by immunization with the autoantigen and the structural properties of autoreactive B- or T-cell receptors derived from individuals with autoimmune diseases clearly speak for the crucial role of the autoantigen in the initiation of the autoimmune response. One may thus wonder whether the gene encoding the putative initiating autoantigen is polymorphic and if so, whether the polymorphism takes part in disease susceptibility. Involvement of autoantigen gene polymorphism has been reported in two major autoimmune diseases, type 1 diabetes (variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism upstream of the insulin gene) [82] and myasthenia gravis (microsatellite polymorphism in the first intron of muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene) [83]. Although recent experiments, suggest that insulin VNTR alleles modulate insulin expression in human thymus and thus might control central tolerance, the significance of these associations still remains poorly understood.

These observations and the demonstration that the *DSG1* gene is polymorphic in bovine [84] prompted us to ask whether *DSG1* constitutes a candidate gene predisposing to PF. Two polymorphic markers were identified. The first is made of a variant haplotype of five mis-sense mutations located on the part of the gene encoding the fourth and fifth extracellular domains of the protein and was not found to be associated with PF. The second marker consists of a single silent T to C transition at position 809 and was significantly more frequent in French Caucasian PF patients than in controls [85]. Interestingly, the increased frequency of mutation 809 (C), notably at the homozygous state (809 (C/C)) was also observed in PF patients recruited in Tunisia where the epidemiology of the disease is different, strengthening the observation made in France [86]. Thus, two different association studies performed in different epidemiological situations, indicate that *DSG1* is involved either in PF susceptibility or in the production of anti-Dsg1 antibodies. This question will be addressed by studying *DSG1* polymorphism in PV patients producing anti-Dsg1 antibodies.

The role of a silent mutation of the coding sequence of *DSG1* in PF physiopathology remains questionable. An association with another polymorphism located elsewhere in the coding or regulatory sequences of *DSG1*, is currently under investigation. The mutation could also be involved in alternative splicing of Dsg1 pre-mRNA transcripts leading to the synthesis of

alternative transcripts of *DSG1* and of untolerized intron-encoded amino acid sequences responsible for T-cell tolerance breakage. Further analysis of French Caucasian PF patients showed that a combination of HLA DR4, the HLA-DRB1 allele significantly associated with PF, and C/C (809) genotype conferred a stronger risk of PF development than either alone and that the effect of both risk factors was more than additive [76]. This model is consistent with an epistasis between DR4 and C/C genotype in PF susceptibility and is reminiscent of results obtained in two other organ-specific autoimmune diseases, in which the interactive effect of two different loci was demonstrated: type 1 diabetes with the insulin gene and the HLA region [87], and myasthenia gravis with acetylcholine receptor alpha-subunit gene (CHRNA) and two different HLA loci [88]. Thus, this observation underlines the complexity of genetic interactions in the development of autoimmune diseases and constitutes a model to study and further the understanding of epistasis between genes encoding presentation molecules and autoantigens.

5.3. IGH and IGL genes

The fundamental functions of B-cell receptor (BCR) in autoimmune responses which are now unambiguously demonstrated to be driven by antigens, allow to consider the polymorphic *IGH* and *IGL* loci as candidate genes of susceptibility to autoimmune diseases. Both V and C segments of the *IGH* and *IGL* loci are polymorphic and several autoimmune diseases were shown to be associated with *IGHC* [89], *IGHV* [90] or *IGKC* [91,92] polymorphisms. Only few studies analyzed the role of IG locus polymorphism in pemphigus susceptibility. One study was performed to determine whether *IGH* polymorphism was associated with PV [93]. While significant differences in the distribution of *IGHC* allelic frequencies were observed between 12 PV patients and controls, a significant difference was found for a VH3 polymorphism. Although, the small size of the patient group could introduce bias and makes the significance of the result questionable, this study invites to further study the *IGH* locus polymorphism in pemphigus if a restricted usage of V_H genes was demonstrated in the anti-Dsg1 or anti-Dsg3 antibody responses. Similarly, the observation that IgG4 constitutes the major pathogenic IgG subclass [94,95] should invite to determine whether polymorphic variants of the switch gamma 4 sequence that were recently described [96], are associated with PV or PF. Interestingly, anti-Dsg1 and anti-Dsg3 IgG4 antibodies preferentially if not exclusively, express kappa light chains. This observation and the previous reports indicating that several autoimmune diseases are associated with *IGKC* polymorphism prompted us to determine whether PV or PF is associated with allotypic markers of immunoglobulin kappa. By using a PCR-digestion procedure, we showed that both PV and PF in the sporadic and endemic form observed respectively in France and Tunisia, were not associated with a Km allotype [97].

5.4. Other candidate genes

Other genes of the MHC have been studied in pemphigus. Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin alpha (LTA) are cytokines with immunoregulatory properties whose genes are located in the class III region of the human MHC and display polymorphism. In a study performed in a large series of patients with Brazilian endemic pemphigus and controls, no associations were found between LTA/ or TNF/ single nucleotide polymorphism (SNP) and PF indicating that genetic variability of these loci does not participate in susceptibility/resistance to the disease [98]. However, in an association study involving a limited number of PF patients, a positive association of TNFα promoter gene polymorphism with sporadic PF was observed [99]. Polymorphisms of *TAP1* and *TAP2* genes that are located in the HLA class II locus and that encode for the transporters associated with antigen processing (TAP) molecules were recently analyzed in Japanese pemphigus patients but no association was found with the disease [100]. Other candidate genes were studied, particularly those that encode for cytokines that have been involved in pemphigus. In this regard, a recent study demonstrated that the SNP located at position −174 of the *IL6* gene is associated with FS. Indeed, the C/C genotype was shown to be protective while the G allele predispose to FS, suggesting a role of IL6 in the pathophysiology of pemphigus [101].

6. Conclusion

Finally, epidemiological and association studies firmly established that genetic factors are involved in the occurrence of pemphigus and that HLA class II genes or genes in strong linkage disequilibrium participate in disease susceptibility. However, MHC haplotype alone is insufficient for development of the disease and it is very likely, that pemphigus, like other autoimmune diseases, are complex and polygenic disorders in which many genes with various penetrance operate and interact to control the disease process. The positive epistasis observed between the *HLA* and *DSG1* loci illustrates this complexity and, thus, the difficulty to identify genetic factors in pemphigus. Genome scan studies require a large number of multiplex families that may be difficult to recruit at least in PV and sporadic PF and are often beyond financial resources of laboratories. These studies might be performed in Brazilian endemic pemphigus which frequently involves family members allowing to recruit a large number of multiplex families

and reach sufficient statistical power. However, the power of association studies, in particular family-based association when correctly designed, the recent identification of the patterns of genetic variation in the human genome [102], and the better understanding of the pathophysiology of PV and PF should invite to use association studies to dissect the genetic basis of the different varieties of pemphigus. Several non-MHC candidate genes to which a role can be assigned in the disease pathogenesis or an intermediate phenotype (anti-Dsg autoantibodies) could be selected and studied involving large number of cases and controls. Among these candidate genes, those showing genetic conservation across all populations [103] should be prioritized for minimizing heterogeneity of population and their confounding effects.

References

[1] Anhalt GJ, Diaz LA. Prospects for autoimmune disease: research advances in pemphigus. JAMA 2001;285:652–4.

[2] Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med 1982;306: 1189–96.

[3] Roscoe JT, Diaz LA, Sampaio SAP, Castro RM, Labib H, Patel H, et al. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. J Invest Dermatol 1985;85:538–41.

[4] Moncada B, Kettelsen S, Hernandez-Moctezuma JL, Ramirez F. Neonatal pemphigus vulgaris: role of passively transferred pemphigus antibodies. Br J Dermatol 1982;106:465–7.

[5] Amagai M, Kaparti S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. J Clin Invest 1992;90:919–26.

[6] Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. J Immunol 2001;167:5439–48.

[7] Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikaw T. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. J Dermatol 2001;26:55–61.

[8] Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed A. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and non pathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:5239–43.

[9] Bhol K, Ahmed AR. Production of non-pathogenic human monoclonal antibodies to desmoglein 3 from pemphigus vulgaris patient. Autoimmunity 2002;35:87–91.

[10] Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz SI. Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol 1998;110:62–6.

[11] Hertl M, Karr RW, Amagai M, Katz SI. Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol 1998;110:388–92.

[12] Hertl M, Riechers R. Analysis of the T cells that are potentially involved in autoantibody production in pemphigus vulgaris. J Dermatol 1999;26:748–52.

[13] Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, Ding X, Fairley JA, Diaz LA. T lymphocytes from a subset of patients with pemphigus vulgaris respond to both desmoglein-3 and desmoglein-1. J Invest Dermatol 1997;109:734–7.

[14] Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, Fernadez-Vina MA, Stastny P, Fairley JA, et al. Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. J Clin Invest 1997;99:31–40.

[15] Lin MS, Fu CL, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Moraes JR, et al. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Clin Invest 2000;105:207–13.

[16] Hacker-Foegen MK, Fairley JA, Lin MS. T cell receptor gene usage in desmoglein-3-specific T lymphocytes from patients with pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol 2003;121:1365–72.

[17] Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, Wassmuth R, Grotzinger J, Schultz E, et al. T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. J Immunol 2004;172:3883–92.

[18] Moesta AK, Lin MS, Diaz LA, Sinha AA. T cell receptor b chain gene usage in endemic pemphigus foliaceus (folgo sevagem). J Invest Dermatol 2002;11:377–83.

[19] Mimouni D, Foedinger D, Kouba DJ, Orlow SJ, Rappersberger K, Sciubba JJ, et al. Mucosal dominant pemphigus vulgaris with anti-desmoplakin autoantibodies. J Am Acad Dermatol 2004;51:62–7.

[20] Kazerounian S, Mahoney MG, Uitto J, Aho S. Envoplakin and periplakin, the paraneoplastic pemphigus antigens, are also recognized by pemphigus foliaceus autoantibodies. J Invest Dermatol 2000;115:505–7.

[21] Anhalt GJ. Paraneoplastic pemphigus. J Investig Dermatol Symp Proc 2004;9:29–33.

[22] Morahan G, Morel L. Genetics of autoimmune diseases in humans and animal models. Curr Opin Immunol 2002;14: 803–11.

[23] Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J Clin Invest 2000;105:625–31.

[24] Hans-Filho G, dos Santos V, Katayama JH, Aoki V, Rivitti EA, Sampaio SAP, et al. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. J Invest Dermatol 1996;107:68–75.

[25] Robledo MA, Prada S, Jaramillo D, Leon W. South American pemphigus foliaceus: study of an epidemic in El Bagre and Nechi, Colombia 1982 to 1986. Br J Dermatol 1988;118:737–44.

[26] Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, Turki H, Nouira R, Jomaa B, et al. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. J Invest Dermatol 1995;104:302–5.

[27] Lombardi ML, Borges PC, Chaul A, Sampaio SAP, Rivitti EA, Friedman H, et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Invest Dermatol 1992;98: 847–50.

[28] Mutassim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ. Drug induced pemphigus. Dermatol Clin 1993;11:463–71.

[29] Pisanti S, Sharav Y, Kaufman E, Posner LN. Pemphigus vulgaris: incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex, and initial lesion. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1974;38:382–7.

[30] lnaba Y, Kitamura K. Statistic analysis on pemphigus patients in Japan. In: Imamura S, editor. Annual report of research committee of rare intractable diseases. The Ministry of Health and Welfare of Japan. 1991. p. 147–51.

[31] Wilson CL, Wojnarowska F, Dean D, Pasricha JS. IgG subclasses in pemphigus in Indian and UK populations. Clin Exp Dermatol 1993 May;18(3):226–30.

[32] Stanley JR, Klaus-Kovtun V, Sampaio SA. Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. J Invest Dermatol 1986;87:197–201.
[33] Simon DG, Krutchkoff D, Kaslow RA, Zarbo R. Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972–1977. Arch Dermatol 1977;116:1035–7.
[34] Aboobaker J, Morar N, Ramdial PK, Hammond MG. Pemphigus in South Africa. Int J Dermatol 2001;40:115–9.
[35] Hietanen J, Salo OP. Pemphigus: an epidemiological study of patients treated in Finnish hospitals between 1969 and 1978. Acta Derm Venereol 1982;62:491–6.
[36] Naldi L, Bertoni M, Cainelli T. Feasibility of a registry of pemphigus in Italy: two years experience. Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Dermatologia (GISED). Int J Dermatol 1993;33:287–8.
[37] Laskaris G, Sklavounou A, Stavrou A, Stavropoulou K. Familial pemphigus vulgaris with oral manifestations affecting two Greek families. J Oral Pathol Med 1989;18:49–53.
[38] Katzenelson V, David M, Zamir R, Mellibovsky J, Idises C, Sandbank M. Familial pemphigus vulgaris. Dermatologica 1990;181:48–50.
[39] Feinstein A, Yorav S, Movshovitz M, Schewach-Millet M. Pemphigus in families. Int J Dermatol 1991;30:347–51.
[40] Stavropoulos PG, Zarafonitis G, Petridis A, Hashimoto T, Harman KE, Black MM. Pemphigus vulgaris in two sisters. Acta Derm Venereol 2001;81:149.
[41] Firooz A, Mazhar A, Ahmed AR. Prevalence of autoimmune diseases in family members of patients with pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol 1994;33:319–20.
[42] Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Beutner EH, et al. Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. J Exp Med 1993;177:419–24.
[43] Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A, et al. Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. J Am Acad Dermatol 1997;36:44–52.
[44] Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. J Invest Dermatol 1989;92:4–12.
[45] Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidin B, Biddison WE, Mc Farland HF, et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95: 9979–84.
[46] Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 autoimmune diseases-a general suscepitibility gene to autoimmunity? Genes Immun 2000;1:170–84.
[47] Schaid DJ, Sommer SS. Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. Am J Hum Genet 1994;55:402–9.
[48] Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet 1993;52: 506–16.
[49] Altumuller J, Palmer LJ, Fischer G, Sherb H, Wjst M. Genomic scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. Am J Hum Genet 2001;69:936–50.
[50] Field LL. Genetic linkage and association studies of type I diabetes: challenges and rewards. Diabetologia 2002;45:605–22.
[51] Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. Hum Mol Genet 1998;7:1229–34.
[52] Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. Nature 1994;371:130–6.
[53] Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, et al. Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:7658–62.
[54] Loiseau P, Lecleach L, Prost C, Lepage V, Busson M, Bastuji-Garin S, et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. J Autoimmun 2000;15:67–73.
[55] Delgado JC, Yunis DE, Bozon MV, Salazar M, Deulofeut R, Turbay D, et al. MHC class II alleles and haplotype in patients with pemphigus vulgaris from India. Tissue Antigens 1996; 48:668–72.
[56] Lombardi ML, Mercuro O, Tecame G, Fusco C, Ruocco V, Salerno A, et al. Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens 1996;47:228–30.
[57] Lombardi ML, Mercuro O, Ruocco V, Schiavo AL, Lombari V, Guerrera V, et al. Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. J Invest Dermatol 1999;113:107–10.
[58] Carcassi C, Cottoni F, Floris L, Vacca A, Mulargia M, Arras M, et al. HLA haplotypes and class II molecular alleles in Sardinian and Italian patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens 1996;48:662–7.
[59] Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas AI, Rehman SB, et al. Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients. Hum Immunol 1997;57:110–9.
[60] Gonzalez-Escribano MF, Jimenez G, Walter K, Montes M, Perez-Bernal AM, Rodriguez MR, et al. Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens 1998;52:275–8.
[61] Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, Szafer F, Steinman L, Horn G, et al. HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:3504–8.
[62] Scharf SJ, Friedmann A, Steinman L, Brautbar C, Erlich HA. Specific HLA-DQB and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:6215–9.
[63] Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Alper CA, Awdeh Z, et al. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:5056–60.
[64] Miyagawa S, Higashimine I, Iida T, Yamashina Y, Fukumoto T, Shirai T. HLA-DRβ1*04 and DRβ1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese. J Invest Dermatol 1997;109:615–8.
[65] Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, Nishikawa T, et al. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. Tissue Antigens 1999;54:333–40.
[66] Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Yunis JJ, Delgado JC, Yunis DE, et al. Identical MHC markers in non-Jewish Iranian and Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris: possible common central Asian ancestral origin. Hum Immunol 1997;57:62–7.
[67] Riechers R, Grotzinger J, Hertl M. HLA class II restriction of autoreactive T cell responses in pemphigus vulgaris: review of the literature and potential applications for the development of a specific immunotherapy. Autoimmunity 1999;30:183–96.
[68] Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas AL, Rehman SB, et al. Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients. Hum Immunol 1997;57:110–9.
[69] Nishifuji K, Amagai M, Kuwana M, Iwasaki T, Nishikawa T. Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus

vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production. J Invest Dermatol 2000;114:88–94.

[70] Matzner Y, Erlich HA, Brautbar C, Sanilevitch A, Landau M, Brenner S, et al. Identical HLA class II alleles predispose to drug-triggered and idiopathic pemphigus vulgaris. Acta Derm Venereol 1995;75:12–4.

[71] Petzl-Erler ML, Santamaria J. HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo-selvagem)? Tissue Antigens 1989;33:408–14.

[72] Pavoni DP, Roxo VM, Marquart Filho A, Petzl-Erler ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. Genes Immun 2003;4:110–6.

[73] Moraes ME, Fernandez-Vina M, Lazaro A, Diaz LA, Filho GH, Friedman H, et al. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. Tissue Antigens 1997;49:35–40.

[74] Moraes JR, Moraes ME, Fernandez-Vina D, Diaz LA, Friedman H, Campbell IT, et al. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (folgo selvagem) in endemic area of Brazil. Immunogenetics 1991;33:388–91.

[75] Cerna M, Fernandezvina M, Friedman H, Moraes JR, Moraes ME, Diaz L, et al. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo-selvagem) in avante Indians. Tissue Antigens 1993;42:138–40.

[76] Martel P, Gilbert D, Busson M, Loiseau P, Lepage V, Drouot L, et al. Epistasis between DSG1 and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. 2002. Genes Immun 2001;3:205–10.

[77] Cucca F, Lampis R, Frau F, Macis D, Angius E, Masile P, et al. The distribution of DR4 haplotypes in Sardinia suggests a primary association of type I diabetes with DRB1 and DQB1 loci. Hum Immunol 1995;43:301–8.

[78] Martel P, Loiseau P, Joly P, Busson M, Lepage V, Mouquet H, et al. Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1*03 allele. J Autoimmun 2003;20:91–5.

[79] Slomov E, Loewenthal R, Goldberg I, Korostishevsky M, Brenner S, Gazit E. Pemphigus vulgaris in Jewish patients is associated with HLA-A region genes: mapping by microstellite markers. Hum Immunol 2003;64:771–9.

[80] Gazit E, Slomov Y, Goldberg I, Brenner S, Loeventhal R. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. Hum Immunol 2004;65:39–46.

[81] Wucherpfennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, et al. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:11935–9.

[82] Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VN alleles at the IDDM2 locus. Nat Genet 1997;15:289–92.

[83] Garchon HJ, Djabiri F, Viard JP, Gajdos P, Bach JF. Involvement of human muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene (CHRNA) in susceptibility to myasthenia gravis. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:4668–72.

[84] Puttagunta S, Mathur M, Cowin P. Structure of DSG1, the bovine desmosomal cadherin gene encoding the pemphigus foliaceus antigen. Evidence of polymorphism. J Biol Chem 1994;269:1949–55.

[85] Martel P, Gilbert D, Drouot L, Prost C, Raux G, Delaporte E, et al. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1 the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. Genes Immun 2001;2:41–3.

[86] Ben Ayed M, Martel P, Zitouni M, Gilbert D, Turki H, Mokni M, et al. Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with desmoglein-1 gene polymorphism. Genes Immun 2002;3:378–9.

[87] Cordell HJ, Todd JA, Bennett ST, Kawaguchi Y, Farrall M. Two-locus maximum lod score analysis of a multifactorial trait: joint consideration of IDDM2 and IDDM4 with IDDM1 in type 1 diabetes. Am J Hum Genet 1995;57:920–34.

[88] Djabiri F, Caillat-Zucman S, Gajdos P, Jais JP, Gomez L, Khalil I, et al. Association of the AchRalpha-subunit gene (CHRNA), DQAI*0101, and the DR3 haplotype in myasthenia gravis. Evidence for a three-gene disease model in subgroup of pattern. J Autoimmun 1997;10:407–13.

[89] Dugoujon JM, Cambon-Thomsen A. Immunoglobulin allotypes (GM and KM) and their interactions with HLA antigens in autoimmune diseases: a review. Autoimmunity 1995;22:245–60.

[90] Walter MA, Gibson WT, Ebers GC, Cox DW. Susceptibility to multiple sclerosis is associated with the proximal immunoglobulin heavy chain variable region. J Clin Invest 1991;87:1266–73.

[91] Dondi E, Gajdos P, Bach JF, Garchon HJ. Association of Km3 allotype with increased serum levels of autoantibodies against muscle acetylcholine receptor in myasthenia gravis. J Neuroimmunol 1994;51:221–4.

[92] Raux G, Gilbert D, Joly P, Daveau M, Martel P, Christ M, et al. Association of KM genotype with bullous pemphigoid. J Autoimmun 2000;14:79–82.

[93] Gibson WT, Walter MA. The immunoglobulin heavy chain and disease association: application to pemphigus vulgaris. Hum Genet 1994;94:675–83.

[94] Warren SJP, Arteaga LA, Rivitti EA, Aoki V, Hans-Filho G, Qagish BF, et al. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. J Invest Dermatol 2003;120:104–8.

[95] Warren SJP, Lin MS, Giundice GJ. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. N Engl J Med 2000;343:23–30.

[96] Pan Q, Rabbani H, Hammarstrom L. Characterization of human gamma 4 switch region polymorphisms suggests a meiotic recombinational hot spot within the Ig locus: influence of S region length on IgG4 production. J Immunol 1998;161:3520–6.

[97] Zitouni M, Martel Ph, Ben Ayed M, Raux G, Gilbert D, Joly P, et al. Pemphigus is not associated with allotypic markers of immunoglobulin kappa. Genes Immun 2002;3:50–2.

[98] Roxo VM, Pereira NF, Pavoni DP, Lin MT, Hansen JA, de O Poersel C, et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus. Are there any associations? Tissue Antigens 2003;62:394–400.

[99] Torzecka JD, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, Borowiec M, Ptasinska A, Woszczek G, et al. Tumour necrosis factor-alpha polymorphism as one of the complex inherited factors in pemphigus. Mediators Inflamm 2003;12:303–7.

[100] Niizeki H, Kumagai S, Kanagawa S, Amagai M, Yamashina Y, Asada H, et al. Exclusion of the TAP1 and TAP2 genes within the HLA class II region as candidate susceptibility genes to pemphigus in the Japanese population. J Dermatol Sci 2004;36:122–4.

[101] Pereira NF, Hansen JA, Lin MT, Roxo VM, Braun K, Petzl-Erler ML. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. Cytokine 2004;28:233–41.

[102] Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. Science 2002;296:2225–9.

[103] Grossman I, Avidan N, Singer C, Paperna T, Lancet D, Beckmann JS, et al. Genomic profiling of interpopulation diversity guides prioritization of candidate-genes for autoimmunity. Genes Immun 2004;5:493–504.

RESUME

Les pemphigus sont des maladies auto-immunes spécifiques d'organe qui affectent la peau et les muqueuses. Ils sont caractérisés par la production d'autoanticorps pathogènes dirigés contre des protéines du desmosome, plus particulièrement, les desmogléines qui permettent l'adhésion entre eux des kératinocytes de l'épiderme. Au cours des pemphigus superficiels (PS), la réponse auto-immune est dirigée contre la desmogléine 1 (Dsg1). Chez les malades atteints de PS, des lymphocytes T autoréactifs vis à vis de la Dsg1 sont présents et interviennent dans la production d'autoanticorps anti-Dsg1. Cet autoantigène est aussi la cible de la réponse auto-immune au cours d'autres formes de pemphigus tels que les pemphigus vulgaire et paranéoplasique et par conséquent, semble jouer un rôle clé dans ces maladies.

Depuis plus d'une décennie, le rôle de l'autoantigène lui-même dans l'initiation, la propagation et la pérennisation de la réponse auto-immune a été conforté par de nombreux arguments expérimentaux. En nous appuyant sur ce concept, nous avons entrepris d'étudier l'intervention de la Dsg1 dans les mécanismes physiopathologiques qui concourent au développement des pemphigus.

Dans un premier temps, nous avons démontré l'expression dans l'épiderme humain, d'une isoforme tronquée de la Dsg1 générée par épissage alternatif des transcrits *DSG1*. Cette Dsg1 soluble est porteuse d'une séquence peptidique spécifique qui se fixe avec une forte affinité à certaines molécules HLA de classe II de susceptibilité au PS en particulier, à la molécule DRB1*0102. Ce peptide est par ailleurs capable d'induire la prolifération de cellules mononucléées du sang périphérique chez 50% des malades atteints de la forme sporadique de PS. Ces patients expriment des allèles HLA de classe II associés à la maladie et deux d'entre eux sont porteurs de la molécule DRB1*0102. Ainsi, la modification de la Dsg1 par épissage alternatif pourrait-elle intervenir dans la rupture de la tolérance au niveau du compartiment T chez les individus prédisposés génétiquement par l'expression de certains allèles HLA de classe II et *in fine*, conduire à l'initiation d'une réponse auto-immune B dirigée contre la Dsg1.

En second lieu, nous avons observé une diversification de la réponse anticorps chez des souris normales immunisées avec la région extracellulaire recombinante de la Dsg1. Les animaux immunisés produisent non seulement des IgG dirigées contre la Dsg1 mais aussi, contre d'autres protéines de l'épiderme. Nous avons dérivé cinq anticorps monoclonaux à partir des splénocytes isolés de ces souris et montré que trois d'entre eux sont dirigés spécifiquement contre la Dsg1. Les deux autres, 10A1 et CK1, ne réagissent pas avec la Dsg1 mais reconnaissent des protéines épidermiques de plus haut poids moléculaire, compatible avec ceux des autoantigènes de la famille des plakines spécifiquement reconnus par les anticorps au cours du pemphigus paranéoplasique, e.g. l'envoplakine et la périplakine. Grâce à une analyse protéomique ciblée combinant l'immunocriblage d'une carte protéique 2D d'épiderme humain et la spectrométrie de masse MALDI-ToF, nous avons montré que la protéine cible du 10A1 est l'envoplakine, et que le CK1 reconnaît à la fois l'envoplakine et la périplakine. Ainsi, en accord ce modèle expérimental murin, la réponse B anti-Dsg1 pourrait-elle gouverner la réponse vis à vis d'autres protéines du desmosome en particulier, les plakines, mimant de ce fait la diversité de la réponse auto-immune B observée au cours du pemphigus paranéoplasique.

Enfin, nous démontrons par des analyses en PCR que l'ARNm de la Dsg1 est exprimé dans le thymus humain normal, que son expression augmente avec l'âge et de ce fait, que l'absence de l'expression thymique de cette autoantigène ne constitue pas l'origine de la rupture de la tolérance qui concoure au développement des PS.

Nos résultats mettent en exergue le rôle la Dsg1 dans le processus auto-immun au cours des pemphigus, d'une part, à la phase d'initiation, avec l'intervention de cet autoantigène modifié par épissage alternatif dans la réponse lymphocytaire T et d'autre part, à la phase de propagation, avec la diversification de la réponse anticorps vis à vis d'autres antigènes desmosomiaux induite chez des souris normales immunisées avec cet autoantigène.

MOTS-CLEFS : Auto-immunité / Autoantigène / Desmogléine 1 / Desmosome / Epissage alternatif / Extension épitopique / HLA / Pemphigus / Plakine / Thymus.