

2 mai 2950.5

Université de Montréal

**Contribution à l'immunodiagnostic des maladies auto-immunes vésico-bulleuses
sous-épidermiques du chien**

par

Claude Favrot

Département des Sciences Cliniques
Faculté de Médecine Vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences
en sciences vétérinaires
option sciences cliniques

Décembre 2001

© Claude Favrot, 2002



SF
607
U54
2002
V.006

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Contribution à l'immunodiagnostic des maladies auto-immunes vésico-bulleuses
sous-épidermiques du chien**

Présenté par :

Claude Favrot

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Monique Doré, présidente-rapporteuse du jury

Dr Manon Paradis, directrice de recherche

Dr Nadia Pagé, membre du jury

Mémoire accepté le 20 février 2002

SOMMAIRE

Les maladies auto-immunes sous-épidermiques vésico-bulleuses (MAISEVB) canines constituent un groupe de maladies caractérisées par la présence d'autoanticorps circulants ciblant certains antigènes de la membrane basale de l'épiderme et par la formation de vésico-bulles. Depuis 1995, différentes entités ont été identifiées par la mise en évidence des mêmes antigène-cibles que dans les maladies humaines équivalentes. En particulier, la pemphigoïde bulleuse, l'épidermolysie bulleuse acquise et la pemphigoïde des muqueuses ont été décrites tant sur le plan clinique qu'histologique et immunologique. Se basant sur ces descriptions, il a été possible de réunir 33 serums de MAISEVB canines. L'immunofluorescence indirecte a longtemps eu la réputation, en médecine vétérinaire, d'être un outil peu sensible de diagnostic des MAISEVB. À la lumière de travaux récents, nous avons mis au point un protocole de diagnostic sensible et spécifique de ces maladies, puis nous avons essayé d'approfondir nos connaissances des classes et sous-classes d'immunoglobulines impliquées dans le développement de ces maladies. Nous avons mis en perspective nos travaux avec ceux précédemment publiés tant en médecine vétérinaire qu'en dermatologie humaine.

Mots-clés :

Auto-immunité; canine; chien; dermatose; dermatite; sous-épidermique; bulle; membrane basale; immunoglobulines; immunofluorescence indirecte; pemphigoïde; épidermolysie.

Abstract

Autoimmune subepidermal blistering diseases (AISBD) consist of a group of rare diseases that exhibit circulating autoantibodies targeting the basement membrane zone (BMZ) antigens and resulting in bulla or vesicle formation. Based on the demonstration of the exactly same targeted antigens than in human dermatology, some entities have been reported since 1995. In particular, bullous pemphigoid, epidermolysis bullosa acquisita and mucous membrane pemphigoid have been described on clinical, histological and immunological grounds. Based on these findings, 33 serums of AISBD canine patients have been collected. In the past, indirect immunofluorescence (IIF) was not deemed a rewarding diagnosing procedure for AISBD in veterinary dermatology. However, based on some recent works, we have established a sensitive and specific IIF diagnostic procedure for AISBD. We have then studied the classes and subclasses of immunoglobulins involved in the pathogenesis of theses diseases. We have compared our findings with the previously published veterinary studies as well as with the human data.

Key-words:

Auto-immune; canine; dog; dermatosis; dermatitis; subepidermal; bulla; immunoglobulin; basement membrane zone; indirect immunofluorescence; pemphigoid, epidermolysis

TABLE DES MATIÈRES :

Sommaire.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Dédicaces.....	xi
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
<u>CHAPITRE PREMIER : RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....</u>	4
1. Histoire naturelle des maladies auto-immunes sous-épidermiques vésico-bulleuses (MAISEVB).....	5
2. Aspects cliniques et histologiques des MAISEVB canines.....	7
3. Structure de la jonction dermo-épidermique et relation structure moléculaire-pathologie.....	10
4. Immunofluorescence indirecte (IFI) et MAISEVB.....	14
<u>CHAPITRE DEUXIÈME : MÉTHODOLOGIE.....</u>	15
1. Détermination du meilleur substrat pour le diagnostic par IFI des MAISEVB.....	16
2. Détermination des classes et sous-classes d'immunoglobulines impliquées dans les MAISEVB.....	17

3. Estimation des sensibilités et spécificités des techniques IFI dans le diagnostic des MAISEVB.....18

CHAPITRE TROISIÈME : ARTICLE N°1.....19

Favrot C, Dunston S, Deslandes J, Paradis M, Olivry T : Effect of substrate selection on indirect immunofluorescence testing of canine auto-immune subepidermal blistering diseases.

The Canadian Journal of Veterinary Research 2002; 66 : 26-30.

Abstract.....	21
Résumé.....	22
Introduction.....	23
Materials and Methods.....	26
Results.....	28
Discussion.....	30
References.....	33

CHAPITRE QUATRIÈME : ARTICLE N°2.....40

Favrot C, Dunston S, Paradis M, Olivry T. Isotype determination of circulating autoantibodies in canine autoimmune subepidermal blistering dermatoses.

Manuscript soumis en janvier 2002 à **Veterinary Dermatology**.

Abstract.....	42
Introduction.....	43
Materials and Methods.....	44
Results.....	48

Discussion.....49

References.....54

CHAPITRE CINQUIÈME: DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.....65

1. Les lèvres intactes et les lèvres clivées par le sel sont les meilleurs substrats canins pour le diagnostic par IFI des MAISEVB.....66

2. Les IgG1, IgE et IgG4 sont les principaux isotypes d'auto-anticorps impliqués dans les MAISEVB.....67

3. Sensibilité et spécificité de l'IFI pour le diagnostic des MAISEVB...69

Conclusion.....73

Bibliographie.....76

Liste des Tableaux

Chapitre 3 :

Table I : Inclusion criteria of canine patients with AISBD.....	36
Table II: Average scores of intact and salt-split substrates.....	37

Chapitre 4:

Table I: Inclusion criteria for AISBD patient sera.....	59
Table II : Data from canine AISBD patients.....	60
Table III : Data from non AISBD dermatological patients.....	61
Table IV : Results of IIF testings for AISBD sera.....	62

Listes des Figures

Chapitre 3 :

- Figure 1 : Substrate : Intact canine dorsal haired skin. Serum : Bullous pemphigoid...39
Figure 2 : Substrate : Intact canine lip. Serum : Epidermolysis bullosa acquisita.....39
Figure 3 : Substrate : Salt-split tongue. Serum : Mucous membrane pemphigoid.....39
Figure 4 : Substrate : Salt-split lip. Serum : Epidermolysis bullosa acquisita.....39

Chapitre 4 :

- Figure 1 : Substrate : Salt-split canine lip. Serum MMP. Dilution 1 :25. Antibody : anti-IgG1- Magnification: x50.....64
Figure 2 : Substrate : Intact canine lip. Serum BP. Dilution 1 :10. Antibody : anti-IgE- Magnification :x50.....64
Figure 3: Substrate: Salt-split lip. Serum EBA. Dilution 1 :10. Antibody :anti-IgG- Magnification :x50.....64

Liste des sigles et abréviations

Ac : anticorps

Ag : antigène

EBA : épidermolysie bulleuse acquise

IFD : immunofluorescence directe

IFI : immunofluorescence indirecte

Ig : immunoglobuline

IgA : immunoglobuline A

IgE : immunoglobuline E

IgG: immunoglobuline G (toutes sous-classes confondues)

IgM: immunoglobuline M

JDE : jonction dermo-épidermique

LAD : maladie à IgA linéaire

LL : *Lamina lucida*

LD : *Lamina densa*

MAI : maladie auto-immune

MAISEVB : maladie auto-immune sous-épidermique vésico-bulleuse

MB : membrane basale

PB : pemphigoïde bulleuse

PM : pemphigoïde des muqueuses

SS: *Salt-split*: clivé par une solution molaire de sel

Dédicaces

A Nika qui partage ma vie et mes aventures dermatologiques.....

A Nelly et Guillaume, qui donnent un sens à tout ce que je fais.....

Remerciements

Je désire remercier en tout premier lieu Manon Paradis qui m'a accueilli dans son équipe, qui m'a conseillé d'accomplir ce travail, qui m'a guidé sans jamais ménager ni son temps ni ses conseils, qui sait, mieux que quiconque partager ses connaissances et ses expériences

Sans Thierry Olivry, ce travail n'aurait pas pu exister. Tout d'abord parce qu'il a contribué à ma venue à Montréal, parce qu'il m'a aidé à choisir mon sujet de recherche, parce qu'il m'a aidé à initier, à poursuivre et à conclure ce travail et parce qu'il a bien voulu, lui aussi, partager avec moi ses connaissances et son expérience de la recherche.....

J'ai une pensée spéciale pour Stanley Dunston, technicien à North Carolina State University, qui m'a initié à l'art difficile des coupes congelées, qui m'a livré les mille et un secrets qui rendent les manipulations moins fastidieuses, avec qui j'ai parfois eu des difficultés de communication mais qui restera l'une des belles rencontre de ce travail.....

Je veux remercier aussi Jules Deslandes qui a partagé son laboratoire avec moi et qui, lui aussi, m'a soutenu dans mon travail de recherche « au quotidien ».....

J'ai eu la chance de passer de nombreuses heures de travail clinique avec Nadia Pagé et Frédéric Sauvé. J'ai beaucoup appris d'eux et avec eux. J'avais l'habitude de travailler seul, ils m'ont accueilli dans leur groupe et de cette expérience-là aussi, j'ai beaucoup appris....

Je veux remercier enfin l'Université de Montréal qui m'a permis d'utiliser le Fonds de Santé Animale pour initier mes recherches et l'European Society of Veterinary Dermatology qui a financé ce travail.

INTRODUCTION

Des maladies de la jonction dermo-épidermique peuvent résulter, chez le chien, soit de mutations des gènes codant pour les protéines d'attachement de cette jonction (épidermolyses bulleuses congénitales), soit de la protéolyse de ces même protéines, en particulier après fixation d'auto-anticorps (maladies auto-immunes). C'est dans ce dernier groupe que se trouvent les maladies dont le sérodiagnostic immunologique sera étudié dans ce travail (Maladies Auto-Immunes Sous-Epidermiques Vésico-bulleuses (MAISEVB), c'est à dire la pemphigoïde bulleuse (PB), la pemphigoïde des muqueuses (PM), et l'épidermolysie bulleuse acquise (EBA)). D'autres pathologies qui ont des pathogénies proches ou différentes peuvent également simuler cliniquement ces maladies (maladies à IgA linéaire, lupus érythémateux systémique bulleux, lupus érythémateux cutané bulleux, érythème polymorphe, lymphome épithéliotrope). Il est de fait impossible de poser un diagnostic de ces maladies sur des seules bases cliniques. L'examen histopathologique permet en général d'écartier quelques éléments du diagnostic différentiel (lymphome cutané, érythème polymorphe, formes typiques des lupus cutanés). Toutefois, le diagnostic définitif demande la mise en œuvre d'un ou plusieurs examens complémentaires tels qu'immunofluorescence directe et indirecte (IFD, IFI), microscopie électronique, immunoprécipitation et immuno-électrophorèse ainsi que ELISA avec peptides recombinants. La lourdeur de ces procédures explique qu'alors que le premier cas canin de pemphigoïde bulleuse a été décrit en 1978 (1), il ait fallu attendre 1995 pour que les cas de MAISEVB soient caractérisés avec certitude du point de vue immunologique (2-5). Au cours de ces études, il a été cependant démontré que les techniques IFI et ELISA pouvaient constituer des outils diagnostics sensibles du diagnostic des MAISEVB.

Notre étude essaiera de déterminer s'il est possible de proposer une procédure diagnostique à la fois sensible, spécifique et applicable dans la pratique courante pour le diagnostic des MAISEVB du chien au moyen de techniques d' IFI.

Nous étudierons 33 serums préalablement collectés et diagnostiqués (22 PM, 5 PB, 6 EBA) et nous suivrons une démarche en trois étapes :

- 1- Détermination du meilleur substrat pour la réalisation d'IFI
- 2- Détermination des isotypes d'auto-anticorps circulants par IFI
- 3- Détermination de la spécificité et de la sensibilité des techniques IFI.

Nous essaierons d'autre part de mettre notre travail en perspective avec ce qui a déjà été fait en médecine vétérinaire et de comparer nos données avec celles de la médecine humaine.

CHAPITRE PREMIER :
RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Historique des MAISEVB

Walter Lever distingue, chez l'homme, la pemphigoïde bulleuse du pemphigus en 1953 (6) sur la base d'arguments cliniques et anatomo-pathologiques. Il s'agit là d'une avancée majeure du fait de la différence pronostique importante entre les deux maladies. Il s'agit aussi de la première étape d'un processus qui amènera non seulement à la caractérisation précise de la pemphigoïde bulleuse avec la découverte des deux antigènes-cibles (BPAg1 :230-kDa en 1981 (7) et BPAg2 :180-kDa en 1984 (8)) mais aussi à la découverte et à la caractérisation de plusieurs autres maladies auto-immunes vésico-bulleuses sous épidermiques. Parmi celles-ci, citons la pemphigoïde cicatricielle (9), aujourd'hui préférentiellement appelée pemphigoïde des muqueuses (PM), et la maladie à IgA linéaire (LAD) (10). L'épidermolysie bulleuse acquise (EBA) est elle connue depuis le début du siècle (11) mais sa caractérisation immunologique remonte à 1984 (12). Pendant de nombreuses années, le diagnostic pratique de ces pathologies s'est appuyé sur la conjonction de signes cliniques, histologiques et immunologiques. La PB et la PM, en particulier, étaient considérées comme partageant le même antigène-cible (Domaine NC16A (situé dans la *lamina lucida*) du BP180 (collagène XVII) et ne se distinguaient que par leurs aspects cliniques et histologiques. La PB était ainsi une maladie à tropisme essentiellement cutané, présentant à l'histologie une inflammation d'interface où dominaient les granulocytes éosinophiles (13). D'autre part, la PM était une maladie atteignant essentiellement les muqueuses avec un infiltrat inflammatoire d'interface discret et plutôt mixte (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, lymphocytes, histiocytes) (14). Ces deux entités, par ailleurs, ont longtemps été considérées comme ayant les même caractéristiques immunologiques, du fait des dépôts d'IgG, IgM, C3 à la jonction dermo-épidermique en IFD et du marquage spécifique, en IFI, de la face

épidermique des substrats artificiellement clivés par le sel (SS) (13,14). Plus récemment cependant, il a été mis en évidence que les auto-anticorps circulants de ces deux pathologies pouvaient avoir des profils différents, la BP semblant être la seule à posséder des IgE circulantes spécifiques (15). Plus récemment encore, des rapports convergents ont permis de mettre en doute l'unicité des antigènes-cibles des MAISEVB : ces pathologies ne semblent pas résulter de la lyse par un auto-anticorps donné d'un antigène précis mais plutôt de l'action d'un faisceau d'anticorps appartenant à des isotypes différents ciblant et détruisant des antigènes divers ayant pour seul point commun d'être situés dans la MB. On peut citer, à titre d'exemple, la mise en évidence récente d'anticorps anti-épiligrine dans certains cas de PM chez l'homme (14).

Dans ce groupe de maladies, l'EBA a toujours fait figure de cas particulier du fait de ses caractéristiques cliniques (sévérité plus importante, atteinte de la peau et des muqueuses) et immunologiques très différentes des pemphigoïdes (11). On sait depuis 1984 (12) que l'antigène cible de l'EBA est le collagène VII (domaine NC1) et qu'il est situé dans la *sublamina densa* de la MB. Cette localisation explique, en particulier, que les marquages en IFI sur substrat SS révèlent des fluorescences de la face dermique des clivages, ce qui les distinguent des pemphigoïdes, mais aussi que cette fluorescence paraît parfois intéresser les marges les plus externes du derme superficiel (11).

En médecine vétérinaire, la première description de PB canine remonte à 1978 (1). Elle a été suivie par plusieurs autres descriptions cliniques qui, sous la dénomination générale de PB, recouvrivent des entités cliniques et histologiques différentes. Les caractérisations immunologiques de ces pathologies ont fait défaut jusqu'en 1995 (2). Dans les dernières années cependant, les entités cliniques mises en évidence en

médecine humaine ont été reconnues et caractérisées en médecine vétérinaire (2-5) . Il a été ainsi possible de montrer que la PB canine résultait de la fixation d'anticorps spécifiques au niveau de la *lamina lucida* de la MB, et que l'antigène cible était le même BP 180, collagène XVII qu'en médecine humaine (2). De même, des similitudes entre les formes humaines et canines de l'EBA, de la LAD et de la PM ont été établies (3,4,5).

2. Aspects cliniques et histologiques des MAISEVB canines

Avant d'aborder ces descriptions, il faut se rappeler d'une part que le nombre de cas décrits pour chaque entité reste très limité et que, d'autre part, le terme de pemphigoïde bulleuse a été utilisé jusque très récemment pour désigner l'ensemble des maladies étudiées. Ce faisant, il est difficile, dans les descriptions antérieures à 1995, de rendre à chaque pathologie les caractéristiques cliniques qui lui appartiennent (2).

Il est généralement admis que les PB au sens large, c'est à dire, en fait, les MAISEVB, représentent entre 0,1% (16) et 0,01% (17) des consultations de dermatologie, ce qui en ont fait des pathologies rares. Il semble qu'à l'intérieur de ce groupe la PB sensu stricto soit relativement rare (15%), que l'EBA soit à peine plus fréquente (20%), que la maladie à IgA linéaire soit exceptionnelle et que, par conséquent, la PM soit la forme la moins rare (18). Ce dernier point explique peut-être en partie pourquoi les descriptions anciennes de PB faisaient état d'une atteinte très fréquente des muqueuses alors que les descriptions plus récentes font état d'une atteinte muqueuse plus marginale.

Du point de vue clinique, la caractéristique majeure de ces pathologies est la présence de vésicules turgides du fait de la présence, au plafond de la vésicule, d'une couche cellulaire importante (18), ce qui les distinguent, a priori, des maladies à vésiculation intraépidermique, de type pemphigus dont les vésicules et bulles sont flasques. Il est néanmoins important d'insister sur la fragilité de ces lésions qui sont la plupart du temps fugaces et, donc, difficiles à observer, surtout dans les zones de friction qui sont pourtant un lieu privilégié de leurs développements. Elles peuvent être hémorragiques ou translucides. Ces vésicules peuvent être trouvées dans toutes les pathologies étudiées, sauf dans la LAD, quatrième maladie du groupe, car les vésicules présentes sont microscopiques (18). Bien souvent, les lésions observées sont non spécifiques : érythème, ulcères, excoriations, croûtes voire dépigmentation (PM) (18). Les sites de développement préférentiels de ces pathologies ne sont pas non plus caractéristiques (19). La PB est une maladie essentiellement cutanée (atteinte des muqueuses dans 30% des cas, surtout la muqueuse orale et parfois les muqueuses préputiale ou anale) (18). Elle atteint le ventre, les aines, les extrémités (ongles) et la face (face concave des oreilles). Cette description pourrait être appliquée également à l'EBA, qui présente cependant une atteinte des membranes muqueuses plus importante (4). Les rares cas décrits de LAD font état d'atteinte faciale, podale et orale (5). Du point de vue clinique, la PM se distingue des autres pathologies du groupe par son atteinte préférentiellement muqueuse (bouche, conjonctive mais aussi nez, muqueuses génitale, anale, préputiale), l'atteinte cutanée étant plus marginale (nez, oreille) (3). Des formes plus frustres, insidieuses et moins sévères de PB ont également été décrites (19). Il est à noter que le plan de clivage au sein de la MB est légèrement différent d'une pathologie à l'autre. Cette différence peut se traduire par une tendance plus ou moins grande à laisser des cicatrices après la guérison. De ce point de vue, la

PB et la PM seraient théoriquement les pathologies qui devraient laisser le moins de cicatrice et l'EBA le plus. La réalité clinique ne rend pas toujours compte de ces différences théoriques, même si l'EBA est incontestablement la pathologie la plus sévère du groupe (4,18,19).

Du point de vue anatomopathologique, le phénomène majeur est la présence d'un clivage dermo-épidermique survenant en l'absence d'acantholyse et d'apoptose (19). Les vésicules peuvent être séreuses, hémorragiques ou bien présenter un contenu inflammatoire (granulocytes éosinophiles surtout dans la PB, granulocytes neutrophiles dans les autres cas, faible cellularité pour la PM). Une dermatite d'interface est présente avec une dominante éosinophilique dans le cas de la PB et mixte polynucléaires/mononucléaires dans les autres cas (2,3,4,5,19). Un œdème du derme superficiel est souvent observé. L'épiderme est le plus souvent le siège d'une ulcération mais dans les phases initiales, les modifications peuvent être minimales (3). L'utilisation de coloration spéciale (acide périodique de Schiff (PAS)) permet de mettre à profit l'existence de clivage naturel pour localiser approximativement les antigènes détruits par le processus auto-immun. C'est ainsi qu'il a été possible, sans avoir recours à des immunomarquages, de montrer que le clivage survenait au niveau de la *lamina lucida* dans les PB et PM (3). Le clivage, dans les cas d'EBA, survient plus profondément, au niveau de la *sublamina densa* (4). La compilation des informations disponibles au plan clinique et anatomopathologique permet la plupart du temps d'aboutir au diagnostic de maladie vésiculeuse sous épidermique mais rarement d'avancer un diagnostic plus précis. C'est donc ici que se situe l'intérêt et l'utilité des immunomarquages.

3. Structure de la jonction dermo-épidermique et relation structure moléculaire-pathologie

a. Structure de la jonction dermo-épidermique:

La jonction dermo-épidermique (JDE) comprend le pôle basal des kératinocytes basaux, la *lamina lucida* (LL), la *lamina densa* (LD) et la région sous-basale. Elle représente une structure complexe de 100 nm d'épaisseur qui constitue une interface épithélium-mésenchyme aux fonctions multiples (21). Cette structure est en effet impliquée dans de nombreux processus biologiques comme l'attachement, la migration cellulaire, la réparation tissulaire, la prolifération et la différenciation des cellules épidermiques. C'est également une barrière physique et chimique. C'est par la JDE qu'est assurée la cohésion entre le derme et l'épiderme, ce qui permet une résistance aux forces de traction cutanées externes.

En microscopie électronique, on trouve de l'épiderme vers le derme :

-Le pôle basal des kératinocytes basaux qui contient les hémidesmosomes.

-La membrane basale proprement dite est faite de deux feuillets, la *lamina lucida*, qui n'est peut-être qu'un artefact de la microscopie électronique et la *lamina densa*.

-La région située sous la LD contient les fibrilles d'ancrage.

En fait, deux structures apparaissent plus spécialement responsables de la cohésion de l'épiderme au derme :

-Le complexe hémidesmosome/filaments d'ancrage qui amarre le pôle basal des kératinocytes basaux à la LD (20).

-Les fibrilles d'ancrage qui amarrent la LD au derme (*sublamina densa*) (20).

Du point de vue ultrastructural et moléculaire, on peut représenter cette structure comme suit (21):

-Les filaments intermédiaires (kératine 5 et 14) relient la membrane nucléaire du kératinocyte basal aux hémidesmosomes de la membrane kératinocytaire.

-Les hémidesmosomes sont présents au niveau de la membrane kératinocytaire et sont composés d'une plaque interne et d'une plaque externe.

- La plaque interne est composée (entre autres molécules) de l'antigène n°1 de la pemphigoïde bulleuse (BPAg1= BP1=BP230) et de plectine.
- La plaque externe contient l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et le collagène XVII pour sa partie intracellulaire.

-Les filaments d'ancrage connectent les hémidesmosomes aux fibrilles d'ancrage au travers de la *lamina lucida* et contiennent en particulier le collagène XVII (partie extracellulaire), le LAD-1 (antigène de la maladie à IgA linéaire qui est, en fait, une forme clivée de la fraction extracellulaire de ce même collagène XVII), la laminine 5.

-La *lamina densa* qui est constituée principalement de collagène IV, les laminines 5,6,7,8,10, le nidogène, le perlecan, les fibulines 1 et 2.

-Les fibrilles d'ancrage qui connectent la *lamina densa* au derme grâce au collagène VII.

b. Relation structure moléculaire-pathologie:

Le BPAg1 appartient au groupe des plaquines (on le nomme également BP 230 en raison de son poids en kDa) et il se situe dans la plaque interne de l'hémidesmosome.

Certains patients humains atteints de maladie « BP-like » présentent des Ac ciblant cet Ag mais son implication clinique reste très rare.

Le BPAg2 (ou BP 180 ou collagène XVII) est une molécule trans-membranaire avec une partie située dans la plaque externe de l'hémidesmosome (donc intracellulaire) et une partie extracellulaire. La plupart des Ac rencontrés dans les cas de PB (humaines et animales) ciblent des épitopes situés dans l'ectodomaine NC16A qui est situé juste à l'extérieur du kératinocyte. D'autres Ac cependant ciblent d'autres segments situés dans la LD. Des patients humains atteints de PM possèdent également des Ac ciblant l'extrémité du carboxy-terminale de ce même Ag. D'autres ciblent même une molécule totalement différente mais située dans la même région, l'épiligrine (14).

Le LAD-1 (ou BPAg2 soluble) est sans doute la même molécule que le BPAg2 qui, à la suite d'une protéolyse au niveau de l'ectodomaine NC16A, se trouverait réduit à une taille de 120 kDa puis 97 après perte de l'extrémité du carboxy-terminale. C'est ce résidu moléculaire qui serait ciblé par les Ac spécifiques (surtout des IgA mais aussi des IgG) présents lors de LAD.

La laminine 5 (BM 600, nicéine, kalinine) est une grosse molécule située entre la LL et la LD et reliant les intégrines au collagène VII. Certains humains présentant des PM ont concomitamment des Ac dirigés contre la chaîne a3 de la laminine (celle qui est en contact avec les intégrines).

Le collagène VII est une molécule de 290 kDa et représente le constituant principal des fibrilles d'ancre qui fixent grâce à leur structure en crochet la LD au derme. Des Ac ciblant la fraction NC1 du collagène VII qui est située à la base de la LD ont été mis en évidence chez l'homme et le chien.

c. Définitions immunologiques de MAISEVB :

L'EBA (4) est une maladie se traduisant par la présence d'Ac (IgG, IgM, IgA) circulants ou fixés aux tissus ciblant la fraction non collagénique NC1 aminoterminale du collagène VII des fibrilles d'ancre. Le clivage se réalise au niveau de la *sublamina densa*.

La LAD (5) est une maladie se traduisant par la présence d'Ac (IgA mais aussi IgG) circulants ou fixés aux tissus, ciblant la fraction soluble extracellulaire de 120/97 kDa du collagène XVII. Elle se traduit par un clivage intervenant au niveau de la *lamina lucida*.

La PB (2) est une maladie se traduisant par la présence simultanée ou non d'Ac circulants ou fixés aux tissus ciblant les antigènes BPAg1 (plaquine) et BPAg2 (domaine NC16A du collagène XVII). Le rôle pathogénique des Ac ciblant le BPAg1 n'est pas clairement établi contrairement à celui des Ac ciblant la BPAg 2. Elle se traduit par un clivage intervenant dans la *lamina lucida*, juste sous la membrane cytoplasmique du kératinocyte basal, au niveau de la plaque externe de l'hémidesmosome.

La PM (ou pemphigoïde cicatricielle) (3) est une maladie auto-immune vésiculo-bulleuse sous épidermique se traduisant par une atteinte essentiellement muqueuse. Elle présente une certaine hétérogénéité immunologique avec la présence simultanée ou non d'Ac circulants ou fixés aux tissus ciblants soit le domaine NC16A du collagène XVII, soit un segment de l'extrémité du carboxy-terminale de ce même collagène XVII, ou bien contre la chaîne $\alpha 3$ de la laminine 5 ou encore l'épiligrine (14). Elle pourrait donc se traduire théoriquement soit par un clivage au niveau de la *lamina lucida*, soit au niveau de la *lamina densa*. L'hétérogénéité immunologique de la PM est la conséquence de la volonté généralement affichée de vouloir conserver à

la maladie sa définition clinique et anatomo-pathologique : elle doit être considérée, en quelque sorte, comme une pemphigoïde bulleuse pour laquelle l'atteinte cutanée serait minime et l'atteinte mucosale majeure.

4. Immunofluorescence indirecte et MAISEVB

L'IFI a longtemps été considéré en médecine vétérinaire comme un outil diagnostique peu fiable (19). On reprochait à la technique son manque de sensibilité (19). Pourtant, en médecine humaine, cet outil est employé depuis de nombreuses années dans le diagnostic et la recherche des MAISEVB (11,12,13). Des études font même état de sensibilité pouvant atteindre 100% (23,24). De fait, Bystryn et al. avaient démontré dès 1986 que la fiabilité des IFI dépendait essentiellement des choix de substrats (25). Peu avant, Woodley et al. (26) avaient développé une technique de clivage par le sel (SS) qui permettait de séparer artificiellement le derme de l'épiderme au niveau de la *lamina lucida*. Cette technique présentait le double avantage d'exposer les antigènes cibles qui seront donc plus accessibles aux anticorps sériques et de séparer les antigènes de la PB et PM (face épidermique du clivage) de ceux de l'EBA (face dermique) (26). Cette avancée majeure a été à l'origine de nombreuses études visant à améliorer la sensibilité de cette technique (23, 24), à déterminer les isotypes d'anticorps circulants (15, 27-30), et même à effectuer des suivis cliniques grâce aux titrages des ces mêmes anticorps circulants (31-35).

En médecine vétérinaire, il fallut attendre les travaux d'Iwasaki et al. (2,36) et de Olivry et al. (3,4,5) pour que la fiabilité des IFI utilisant les SS soit démontrée et pour que les études immunologiques précises soient menées chez le chien atteint de MAISEVB.

CHAPITRE DEUXIÈME:
MÉTHODOLOGIE

Dans cette partie, nous nous contenterons de présenter les grandes lignes de la méthodologie mise en œuvre durant notre étude. Les détails de nos travaux sont par ailleurs largement développés dans les chapitres 3 (Effect of substrate selection on indirect immunofluorescence testing of canine autoimmune subepidermal blistering diseases) et 4 (Isotype determination of circulating autoantibodies in canine autoimmune subepidermal blistering dermatoses) du présent mémoire.

1. Détermination du meilleur substrat pour le diagnostic par IFI des MAISEVB :

La première partie de notre travail a consisté à sélectionner les meilleurs substrats pour l'IFI visant au diagnostic des MAISEVB. L'importance de ce choix a été démontré depuis longtemps par Bystryn (25). L'utilisation, avant 1995, de substrats mal adaptés est probablement la cause de la désaffection dans laquelle était tombée cette technique avant 1995 (19). Nous avons utilisé pour cette partie de notre étude 12 sérums de chiens atteints de MAISEVB (4PB, 4EBA, 4PM) et huit substrats canins : peau ventrale, peau dorsale, langue et lèvre, peau dorsale clivée par le sel, peau ventrale clivée par le sel, langue clivée par le sel et lèvre clivée par le sel. Les substrats ont été prélevés sur trois chiens donneurs différents afin d'étudier les variations de fluorescence liées aux chiens donneurs. Chacun de ces substrats a été incubé avec chacun des 12 sérums de chiens malades, puis avec un anticorps anti-IgG canine couplé avec de la fluorescéine. Chaque section a enfin été examinée avec un microscope à fluorescence.

Chaque section a été évaluée en fonction de plusieurs critères :

-Patron de fluorescence

- Intensité de la fluorescence spécifique
- Intensité de la fluorescence d'arrière-plan au niveau dermique et épidermique
- Qualité des sections
- Variations en fonction des chiens donneurs

Au terme de cette première partie d'étude, un ou plusieurs substrats ont été sélectionnés pour les phases suivantes de l'étude.

2. Détermination des classes et sous-classes impliquées dans les MAISEVB :

L'ensemble de ce travail a été effectué avec un substrat canin constitué de lèvres intactes et de lèvres clivées par le sel. Ces substrats ont été incubés avec chacun des sérum des 33 chiens atteints de MAISEVB, préalablement diagnostiqués et collectés (5 PB, 6 EBA, 22 PM) ainsi qu'avec 40 sérum de chiens non-atteints de ces maladies (20 chiens normaux; 20 chiens atteints de maladies dermatologiques non MAISEVB).

Une fois incubés, ces substrats ont été mis au contact d'anticorps anti-IgA, anti-IgE, anti-IgM, anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4. Ces réactions ont été révélées soit par l'utilisation d'anticorps seconds liés à la fluorescéine (pour les IgA, IgG, IgM), soit par l'adjonction d'une troisième étape mettant en jeu un anticorps tertiaire anti-IgG lié à de la fluorescéine (IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Ces manipulations étaient destinées à dresser les profils isotypiques de chacun des patients canins, afin d'essayer de dégager des tendances pour chaque pathologie, pour chaque degré d'évolution de la maladie et pour chaque degré de gravité. Les résultats ont été ensuite comparés avec les (rares) données vétérinaires et avec les plus nombreuses études de médecine humaine.

3. Estimation des sensibilités et spécificités des techniques IFI dans le diagnostic des MAISEVB :

Les résultats collectés lors de la deuxième partie de l'étude seront exploités durant cette troisième phase. Il s'agira alors de déterminer la sensibilité et la spécificité ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives de l'IFI dans le diagnostic de MAISEVB.

CHAPITRE TROISIÈME :

ARTICLE N°1

EFFECT OF SUBSTRATE SELECTION ON INDIRECT
IMMUNOFLUORESCENCE TESTING OF CANINE AUTO-IMMUNE
SUBEPIDERMAL BLISTERING DISEASES

C. Favrot (*,+), S. Dunston (+), J. Deslandes (*), M. Paradis (*) & T. Olivry (+)

(*) Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, CP 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6, (+) Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, NC State University, Raleigh, North Carolina, 27606, USA

Correspondence : C. Favrot

Abstract

The detection by indirect immunofluorescence (IIF) of circulating antibodies in the serum of dogs with auto-immune subepidermal blistering diseases (AISBD) was regarded for a long time as an unrewarding tool. It was however demonstrated in man that the sensitivity of IIF assays depended on the selection of the substrates used. The effects of substrate selection on IIF tests was thus studied by examining sera from 12 dogs with AISBD tested against eight different substrates from three different normal dogs. AISBD patients suffered from bullous pemphigoid (4 sera), mucous membrane pemphigoid (4 sera) and epidermolysis bullosa acquisita (4 sera). Substrates included canine tongue, lip, dorsal haired skin and ventral haired skin. The four same substrates were also split with 1M sodium chloride technique in order to cleave the basement membrane within the *lamina lucida* and to expose the targeted antigens. The strength of the specific fluorescence of each slide was scored after processing for IIF testing with anti-canine IgG polyclonal antibodies. Other criteria such as background fluorescence, easiness of the interpretation and variations within a same substrate were also assessed. Normal canine lip and canine salt-split lip demonstrated consistently stronger intensity of fluorescence and a better easiness of interpretation. We concluded that the performance of IIF tests with such substrates was a reliable tool for the detection of circulating IgG autoantibodies of canine patients with AISBD.

Résumé

La détection par immunofluorescence indirecte (IFI) des anticorps circulants dans le sérum de chiens atteints de maladies auto-immunes sous-épidermiques vésiculo-bulleuse (MAISEVB) a longtemps été considérée comme un outil diagnostique peu fiable. Il a cependant été démontré, chez l'homme, que la sensibilité de cette méthode dépendait du choix des substrats utilisés. L'effet du choix du substrat sur les tests en IFI a donc été étudié en confrontant 12 sera de chiens atteints de MAISEVB à huit substrats canins prélevés sur trois chiens sains différents. Les chiens atteints de MAISEVB souffraient de pemphigoïde bulleuse (4 sérum), de pemphigoïde des muqueuses (4 sérum) et d'épidermolyse bulleuse acquise (4 sérum). Les substrats comprenaient de la langue canine, de la lèvre canine et de la peau poilue canine ventrale et dorsale. Les quatre même substrats furent soumis à une technique de clivage par le sel afin de cliver la jonction dermo-épidermique au milieu de la *lamina lucida* et d'exposer ainsi les antigènes ciblés. La fluorescence de chaque lame a été notée après un traitement en IFI par un antisérum chèvre anti-chien IgG. D'autres critères, telles la fluorescence d'arrière plan, la facilité d'interprétation et les variations à l'intérieur d'un même substrat ont aussi été notés. La lèvre canine ainsi que la lèvre clivée par le sel présentèrent une plus forte intensité de fluorescence ainsi qu'une plus grande facilité d'interprétation. Nous en avons conclu que la réalisation de technique en IFI avec ces deux substrats constituait un bon outil de détection des anticorps circulants des chiens atteints de MAISEVB.

INTRODUCTION

Autoimmune subepidermal blistering diseases (AISBD) consist of a group of mucosal and skin diseases that share common clinical, pathological and immunological features (1). In man, the classification of these diseases is based upon the clinical features and the demonstration of the antigens targeted by circulating antibodies. Animal patients with AISBD have been identified since 1978 and were given the generic diagnosis of bullous pemphigoid (BP) until 1995 (2). However these patients exhibited different clinical and histopathological features. Moreover, the immunological findings and the prognosis were often different (1). Since 1995, some cases of AISBD have been investigated and reclassified using the clinical and immunological nomenclature currently established in man (3-6). Mucous membrane pemphigoid (MMP), epidermolysis bullosa acquisita (EBA) and BP were subsequently individualized and are now considered the most frequently encountered diseases of this group (3-5).

Canine BP is now defined as a blistering dermatosis that affects mainly the face and the ventral aspect of the body and less frequently the mucous membranes. Antibody deposition occurs on the epidermal side of the dermal-epidermal junction and the antigen targeted is the NC16A extracellular domain of collagen XVII (BPAg2, BP180) (3).

Canine MMP is regarded as the mucous counterpart of BP. Antibody deposition occurs usually (but not always) at the very same level of the dermoepidermal junction and the antigenic epitope usually targeted is the same extracellular domain of collagen XVII. However, in man as well as in the dog, MMP appears as an immunologically

heterogeneous disease with other antigens or epitopes being sometimes targeted by circulating antibodies (5).

Canine EBA is a more severe blistering disease that affects both skin and mucous membranes. Antibody deposition occurs on the dermal side of the dermal-epidermal junction. The antigen targeted is the amino-terminus NC1 segment of collagen VII, the latter being the main component of anchoring fibrils (4).

In veterinary dermatology, the detection of circulating antibodies was not deemed a rewarding diagnostic procedure for AISBD because of the low sensitivity of indirect immunofluorescence (IIF) testing (7-9). On the contrary, in human medicine, it has been considered for a long time that IIF can provide valuable information by allowing the detection of circulating antibasement membrane autoantibodies. However studies have shown that the substrate used can greatly influence the results of IIF (10,11). Woodley et al. (12) demonstrated that human skin, when incubated in 1M sodium chloride, fractures cleanly through the *lamina lucida* zone of the epidermal basement membrane. This fracture places the NC16A fragment of the BP antigen on the epidermal side of the split and components of the *lamina densa* (including collagen VII) on the dermal side of the separation. Salt split skin can thus be used to distinguish EBA and BP. Since 1995, veterinary studies have demonstrated that IIF can also be a valuable tool, provided good substrates were used (3,4). The effects of the substrate have also been studied for canine pemphigus and the study has demonstrated marked variation between the results obtained with different substrates (13). The same authors hav also suggested that immunomapping of salt-split skin may be useful for the differential diagnosis of canine AISBD (14).

In the present study, we wish to determine whether the use of different substrates would influence the detection of circulating autoantibodies in dogs with AISBD.

We will demonstrate that normal canine lip and canine salt-split lip are the substrates that offer the most consistent and easiest detection of circulating autoantibodies for dogs affected with this group of diseases.

MATERIALS AND METHODS

Specimen collection

The following substrates were used for IIF: canine tongue, canine lip, canine dorsal haired skin, canine ventral haired skin. In order to evaluate the importance of individual variations within a same substrate, samples were taken by 6 mm biopsy punch on three different healthy dogs, provided by the local shelter immediately after euthanasia. One half of the samples were snap frozen in liquid nitrogen after OCT compound embedding (Tissue-tek, Sakura Finatek, Torrance, CA) and stored at -70°C until IIF was performed (3). The second halves of the samples (Salt Split Technique) were incubated in 1 M sodium chloride solution at room temperature for 24 hours (as described elsewhere) (4). After incubation, the samples were washed in phosphate buffered saline (PBS) then snap-frozen as described above.

Patients

Sera from twelve dogs with AISBD (4 BP, 4 MMP, 4 EBA) were tested by IIF. The diagnosis of AIBSD had been established previously by collation of clinical, histopathological and immunological findings. The criteria for selection used are listed in Table I.

Sera from one normal dog and one dog with pemphigus vulgaris were used as negative and positive control, respectively.

Indirect immunofluorescence

IIF studies were performed as previously described (3). Briefly, 5 µm cryosections were obtained from each sample and air-dried for 15 minutes then fixed in acetone for

15 minutes and rinsed in PBS and blocked in 1% normal rabbit serum solution for 20 minutes. Sections were then incubated with patients sera (1:50) for 60 minutes at room temperature in moist chamber, PBS washed and then incubated 30 minutes with fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated sheep anti-dog IgG (1:60) (ICN Biomedicals Aurora, OH 44202, #67-208). Sections were then PBS-washed, mounted with Vectashield-DAPI cover slipped and observed with an epifluorescence microscope.

Assessed criteria and evaluation of the fluorescence

Each section was scrutinized and the following points were especially assessed:

Pattern of specific fluorescence: The reactivity of the basement membrane zone (BMZ) was classified as linear or reticular. The fluorescence of the lateral aspects of the keratinocytes was also assessed. When salt-split substrates were used, the localization of the fluorescence (dermal or epidermal) was recorded.

Variations within the same substrates: The variation of the intensity of the fluorescence for one type of substrate collected from the three different donor dogs was evaluated.

Intensity of specific fluorescence: This was scored as follows: (0): none, (1): low, (2): medium, (3): strong, (4): very strong specific fluorescence. We have considered as specific a fluorescence that was stronger or as strong as that of the dermis and of the pattern expected from the disease tested.

Intensity of the background fluorescence: The intensity of the dermal background fluorescence was evaluated and compared to that of the BMZ.

Quality of sectioning: Each section was evaluated based on morphologic criteria: aspect of the dermis and of the epidermis, integrity of the BMZ. Finally, the percentage of exploitable sections was evaluated for each substrate.

RESULTS

Fluorescence pattern

On most sections, it was possible to observe closely the fluorescence pattern. It appeared then clearly that BP sera resulted in a reticulated fluorescence that extended to the lateral aspect of the basal keratinocytes (Figure 1). On the contrary, the EBA sera resulted in a strong, thick, linear fluorescence below the basal keratinocytes (Figures 2 and 4). These features were more easily observable on salt split sections. On these sections, BP and MMP sera always resulted in fluorescence of the epidermal side of the clefts and EBA on the dermal side of this cleft (Figures 3 and 4).

Variation within the same substrate

Individual variations within a same substrate were first evaluated. Samples collected from one dog demonstrated stronger fluorescence than the other two (average score: 2.3, two other dogs average score: 1.9). This discrepancy was present for each type of substrate (intact or split) and each disease. Moreover, 5 of 48 sections (10.4%) from this hypereactive dog demonstrated positive specific fluorescence even though the

sections (for at least one section) of another dog did not demonstrate any evidence of fluorescence.

Intensity of the fluorescence

For normal substrates, the average score obtained for the lip was higher (2.1) than those of other substrates (see Figure 1). This average score of the lip sections was higher than those of other sections for each disease (except EBA/ ventral skin) (see Table II).

With salt-split substrates, the same situation was evident. On the other hand, the average score of the salt split substrates was higher than those of the normal substrates (see Table II).

With regard to the individual diseases, the average score of the BP sera were higher than those of the other AIBSD sera. (Table II)

Background fluorescence

The intensity of the dermal fluorescence background was very intense with the tongue substrate (Figure 3) and rendered the interpretation of the specific fluorescence uneasy. On the contrary, the significantly lower background fluorescence of the lip substrate (Figures 2 and 4) rendered the interpretation easier.

Quality of sectioning

With normal substrates, 100% of the tongue sections were usable (e.g. of quality good enough to allow correct interpretation). With other substrates (lip, dorsal skin, ventral skin), percentages of usable sections were 90%, 64% and 75%, respectively .

With salt-split substrates, usable sections for tongue, lip, dorsal skin, ventral skin were 94%, 83%, 81% and 75% respectively.

DISCUSSION

In human medical dermatology, IIF has been regarded as a rewarding diagnostic tool for a long time. In 1985, Beutner et al. (10) noticed that 60 to 80% of the patients with bullous forms of EBA or BP were seropositive for circulatory anti-basement membrane zone antibodies. On the other hand, lower percentages were found in non-bullous forms of EBA and BP and in all subtypes of MMP (cicatricial pemphigoid). In 1986, Bystryn and Sabolinski (11) demonstrated that the nature of substrates used influenced the results of 56 % of assays for BMZ antibodies: 38% of the sera failed to react to one or more than one substrate and other substrates demonstrated different titers when substrates used were different. The best results were obtained using guinea pig oesophagus (96% of positive results with this substrate) and it was possible to reach 100 % when using concomitantly guinea pig oesophagus, monkey oesophagus and human skin.

It is now considered that it is possible to detect circulating anti-BMZ autoantibodies in the serum of almost every human patient with EBA, BP or MMP, provided proper substrates are used (15-17). Salt-split substrates, in which the epidermis is separated from the underlying dermis at the mid-level of the *lamina lucida*, appear particularly suitable for IIF detection of circulating autoantibodies.

In contrast, until 1995, it was considered that IIF testing was unreliable for the diagnosis of BP in dogs (7-9). However, Iwasaki et al. (3) performed IIF assay on the

serum of a canine BP patient and demonstrated circulating anti-BMZ antibodies using canine salt-split skin and bovine tongue. However, the authors failed to detect these antibodies when normal canine skin was used.

In 1998, Olivry et al. (4) detected significant levels of circulating anti-BMZ specific antibodies (IgG and IgA) in a dog with EBA using normal canine tongue and lip as substrates. In another study, these investigators obtained 88% of positive tests with sera of dogs with MMP using canine salt split lip (5).

The aim of our study was to determine the best substrates for IIF assays for detection of circulating IgG autoantibodies using sera of canine patients with AISBD. We obtained biopsies from three different dogs in order to evaluate the importance of individual variations in IIF testing. In 10.4 % (5/48) tests, the immunofluorescence was negative with one particular substrate from one dog and present with the very same substrate from other dogs. Moreover, the substrates of one of the three dogs appeared to yield consistently better results than those of the two others. It seems then wise to use substrates from more than one dog when using such diagnostic assay.

The best normal substrate used during our study was the canine lip. The main drawback of the use of canine tongue was the intensity of the background dermal fluorescence, which sometimes rendered the interpretation of the assay difficult. The use of canine haired skin was even more difficult. Indeed, the thinness of the epidermis made the precise localisation of the fluorescence impossible. Moreover, the presence of hair within the substrate made the cryosectionning more tedious and less suitable for easy interpretation.

The canine lip is characterised by a thick epithelium that allows easy detection of the location and pattern of specific fluorescence. In addition, its dermis often appears to exhibit less background reactivity than that of the tongue. Salt-split canine lip is also a

suitable substrate. In fact, the average intensity of the fluorescence using salt-split lip is higher than that of the normal lip. In addition, the clefting allows to determine on which side of the dermo-epidermal junction the autoantibodies will bind. Indeed, sera from dogs with BP and MMP binded almost always the epidermal side of the clefts, while those from dogs with EBA recognized the dermal side of the splits.

We therefore consider that using two normal canine lips from two different dogs and two salt-split lips from the same two dogs would constitute a suitable tool to detect specific circulating anti-BMZ antibodies in most sera from canine patients with AISBD.

REFERENCES

1. Olivry, T, Chan, LS. Spontaneous animal models of autoimmune blistering dermatoses. *Clin. Dermatol* 2001; in press.
2. Kunkle G, Goldschmidt MH, Halliwell REW. Bullous pemphigoid in a dog: a case report with immunofluorescent findings. *J Am Anim Hosp Assn* 1978; 14: 52-57.
3. Iwasaki T, Olivry T, Lapiere JC, Chan LS, Peavey C, Liu YY, Jones JCR, Ihrke PJ, Woodley DT. Canine bullous pemphigoid (BP): Identification of the 180-kd Canine BP antigen by circulating antibodies. *Vet Pathol* 1995; 37: 387-393.
4. Olivry T, Fine JD, Dunston SM, Chasse D, Tenorio AP, Monteiro-Riviere NA, Chen M, Woodley DT. Canine epidermolysis bullosa acquisita : Circulating autoantibodies target the aminoterminal (NC1) domain of collagen VII in anchoring fibrils. *Vet Dermatol* 1998; 9: 19-31.
5. Olivry T, Dunston SM, Schachter M, Xu L, Nguyen N, Marinkovich MP, Chan LS. A spontaneous model of mucous membrane (cicatricial) pemphigoid, an autoimmune blistering disease affecting mucosae and mucocutaneous junctions. *J Autoimmunity* 2001: in press.
6. Olivry T, Dunston SM, Fahey M, Nguyen N, Marinkovich MP. Autoantibodies against the processed ectodomain of collagen XVII (BPAg2,BP180) define a canine homologue of linear IgA disease in humans. *Vet Pathol* 2000; 37: 302-309.

7. Halliwell REW. Skin diseases associated with autoimmunity Part I. The bullous autoimmune skin diseases. Compend Cont Educ Pract Vet 1980; 2 : 911-918.
8. Scott DW, Walton DK, Slater MR, Smith CA, Lewis RM. Immune-mediated dermatoses in domestic animals : Ten years after- Part I. Compend Cont Educ. Pract Vet 1987; 9: 423-553.
9. Scott DW. Miller WH. Griffin CE. Immunologic skin diseases. Diagnosis of immune mediated skin disease. In Kirk and Muller's Small Animal Dermatology. Ed 4. Philadelphia, WB Saunders Co, 1995: 557-558.
10. Beutner EH, Chorzelski TP, Jablonska S. Immunofluorescence tests. Clinical significance of sera and skin bullous diseases. Int J Dermatol 1983; 24: 405-417.
- 11 Bystryn JC, Sabolinski M. Effects of substrate on indirect immunofluorescence tests for intercellular and basement membrane zone antibodies. J. Am. Acad. Dermatol 1986; 15: 973-977.
12. Woodley DT, Sauder D, Talley MJ, Silver M, Grotendorst G, Qwarnstrom E. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. J Invest Dermatol 1983; 81: 149-153.
13. Iwasaki T, Shimuzu M, Obata M, Ogata M, Nagata M, Yanai T, Kitagawa H, Sasaki Y. Effect of substrate on indirect immunofluorescence test for canine pemphigus foliaceus. Vet Pathol 1996; 33: 332-336.
14. Iwasaki T, Isaji M, Yanai T, Kitagawa H. Sasaki Y. Immunomapping of basement membrane zone macromolecules in canine salt-split skin. J Vet Med Sci 1997; 59: 391-393.

15. Stanley JR. Bullous pemphigoid. In: Fitzpatrick's Dermatology in general medicine Ed 5. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI & Fitzpatrick TB ed. New-york. Mac-Graw-Hill, Inc. 1999: CD-Rom version: Ch.61.
16. Woodley DT, Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis Bullosa acquisita. In: Fitzpatrick's Dermatology in general medicine Ed 5. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI & Fitzpatrick TB Ed.New-york. Mac-Graw-Hill, Inc. 1999. CD rom version: Ch. 66.
17. Sarret Y, Hall R, Cobo LM, Thivolet J, Patton DL, Woodley DT. Salt-split human skin substrate for the immunofluorescence screening of serum from patients with cicatricial pemphigoid and a new method of immunoprecipitation with IgA antibodies. J Am Acad Dermatol 1991; 25: 952-958.
18. Flemming TE, Korman NJ. Cicatricial pemphigoid. J Am Acad Dermatol 2000; 43: 571-591.

Disease	Bullous pemphigoid	M M pemphigoid	Epidermolysis B A
Acquired disease	Yes	Yes	Yes
Erosive or bullous D.	Yes	Yes	Yes
Organs involved	Skin	Mucous membrane	Skin and mucous membrane
Subepidermal vesicles	Yes	Yes	Yes
Cell infiltrate in dermis	Neutrophils, eosinophils	Cell-poor	Neutrophils
Antigen targeted	NC16A collagen XVII	NC16A collagen XVII	NC1 collagen VII
Fluorescence on SSS	Epidermal	Epidermal	dermal

Table I. Inclusion criteria of canine patients with AISBD. SSS= Salt-split substrate. M M Pemphigoid = Mucous membrane pemphigoid. Epidermolysis B A = Epidermolysis Bullosa Acquisita. Antigens targeted were demonstrated with a specific ELISA technique with recombinant peptides (3-5).

Substrates	BP	MMP	EBA	AISBD
Normal tongue	1.5	1.4	1.6	1.5
Normal lip	2.4	1.9	1.9	2.1
Dorsal skin	1.5	1.7	1.4	1.5
Ventral skin	1.5	.9	2.0	1.4
SS tongue	2.3	2.1	2.4	2.3
SS lip	2.4	2.2	2.6	2.4
SS dorsal skin	2.4	1.8	2.0	2.1
SS ventral skin	2.3	1.9	2.0	2.1

Table II. Average scores of normal and salt-split substrates. Specific fluorescence of each slide was scored from 0 to 4. 12 evaluations (sera of 4 canine patients per disease, substrates from three different dogs) were made for each disease and 36 evaluations were made for AISBD collectively. SS= Salt split. BP= Bullous pemphigoid, MMP= Mucous membrane pemphigoid, EBA= Epidermolysis bullosa acquisita. AISBD= Auto-immune subepidermal blistering diseases.

Illustrations:

Figure1: Substrate: Normal canine ventral skin. Serum: Bullous pemphigoid. The thinness of the epidermis renders the localization of the fluorescence uneasy. Magnification 50X.

Figure 2 : Substrate: Normal canine lip. Serum: Epidermolysis bullosa acquisita. The thickness of the epidermis and the low background fluorescence of the dermis renders the interpretation easy. Magnification 50X.

Figure 3 : Substrate: Salt-split tongue. Serum: Mucous membrane pemphigoid. The fluorescence is assessed on the epidermal side of the cleft. Note that the intensity of the background fluorescence is very intense with tongue substrates. Magnification 50X.

Figure 4: Substrate: Salt-split lip. Serum: Epidermolysis bullosa acquisita. The fluorescence is assessed on the dermal side of the cleft.

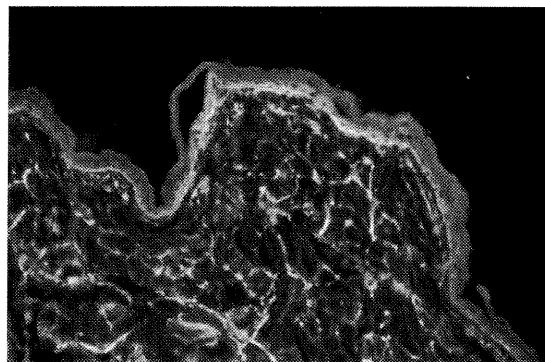


Figure 1.

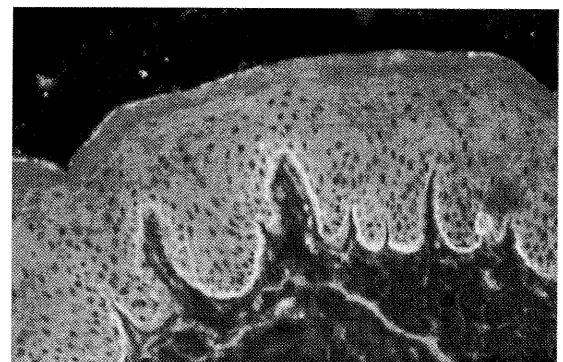


Figure 2.

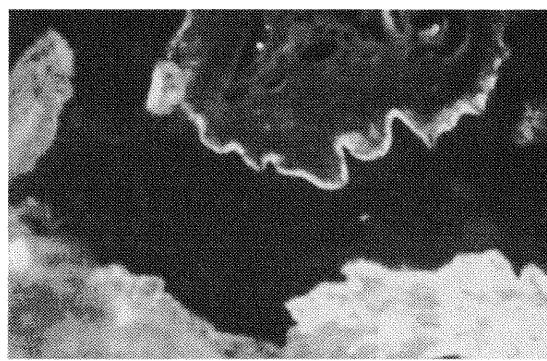


Figure3.

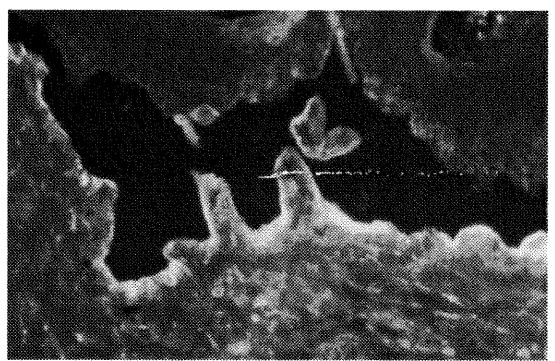


Figure 4.

CHAPITRE QUATRIÈME:

ARTICLE N°2

**ISOTYPE DETERMINATION OF CIRCULATING AUTOANTIBODIES IN
CANINE AUTOIMMUNE SUBEPIDERMAL BLISTERING DERMATOSES**

Claude Favrot (*,+), Stanley M. Dunston (+), Manon Paradis (*) & Thierry Olivry (+)

(*) Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, CP 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6, (+) Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, NC State University, Raleigh, North Carolina, 27606, USA

Correspondence : C. Favrot

Soumis à la revue Veterinary Dermatology: mars 2002

Abstract

Until 1995, canine auto-immune subepidermal blistering diseases (AISBD) have often received the generic denomination of bullous pemphigoid, even though these conditions exhibited different clinical and histological features. Since that date, different conditions have been reclassified using the clinical and immunological nomenclature currently established in human medicine. Immunological investigations have been made by indirect immunofluorescence even though this technique was not deemed a rewarding diagnostic procedure in veterinary dermatology. In fact, the use of salt-split substrate in man as well as in dog has dramatically improved the sensitivity of the method and has made of this technique a powerful investigation tool of the auto-immune skin conditions. We have recently demonstrated that intact canine lip and salt-split canine lip are suitable substrates for the diagnosis of AISBD. In the present study, we have investigated the isotype profile of circulating auto-antibodies involved in the pathogenesis these conditions. Our work was carried out on 33 AISBD (5 bullous pemphigoid, 6 epidermolysis bullosa acquisita, 22 mucous membrane pemphigoid) canine patients. In particular, we have shown that IgG1, IgG4 and IgE are the major isotypes of immunoglobulins in the sera of AISBD canine patients. We have also tried to compare our results with the previously published veterinary studies and with the numerous human investigations.

INTRODUCTION

Auto-immune subepidermal blistering skin diseases (AISBD) refers to a group of conditions that exhibit autoantibodies against components of the basement membrane zone (BMZ). Canine bullous pemphigoid (BP) has been described for the first time in 1978 (1). Since this first description, numerous cases were given the generic denomination of BP but exhibited different clinical features, different histological characteristics and different prognoses. On the contrary, in man, the classification of AISBD was based upon the clinical features but also on the demonstration of the antigens targeted by circulating autoantibodies. Different immunological findings yielded an individualization of BP (2,3), epidermolysis bullosa acquisita (EBA) (4) and mucous membrane pemphigoid (cicatricial pemphigoid) (MMP) (5). Since 1995, the same attempt was made in veterinary dermatology to differentiate canine AISBD on immunological grounds. These attempts led to the individualization of canine BP (6), EBA (7) and MMP (8).

Indirect immunofluorescence (IIF) is often considered a non-suitable technique for the canine AISBD diagnosis (9). On the contrary, in human medicine, it has been considered for a long time that IIF can provide valuable information by allowing the detection of circulating anti-basement membrane autoantibodies. It has however been shown that the value of the tests can be greatly influenced by the choice of substrates (10). In particular, Woodley et al. (11) demonstrated that salt-split skin (skin incubated in 1M sodium chloride) allows better exposition of the BMZ antigens and, subsequently, an increased sensitivity of IIF reactions. Following this work, numerous

studies were carried out to determine the classes and subclasses of immunoglobulins (Ig) involved in AISBD (12-16). In veterinary medicine, it was recently demonstrated that reliability of IIF techniques depends upon the utilized substrates (17, 18). In particular, substrates that have been split by salt (salt-split substrates) and canine lip (split and non-split) were demonstrated rewarding substrates. In order to determine the antibody profile of AISBD canine patients sera and to assess whether these antibodies exhibit a particular class or subclass distribution, we have used these techniques with 33 sera of canine AISBD patients. We have also tried to establish the relationships between the Ig profiles and the clinical and histological aspects of AISBD cases. We have also compared our results with the human ones.

MATERIALS AND METHODS

Substrates:

Two 5 µm frozen sections of intact canine lip (from two different dogs) and two 5µm frozen sections of salt-split canine lip (from the same two dogs) were used for each test. Samples had been snap-frozen in liquid nitrogen after OCT compound embedding (Tissue-tek, Sakura Finatek, Torrance, CA) and stored at -70°C until IIF was performed (6). The salt-split technique has been described elsewhere (17). Lip was chosen as substrate based on a previously reported study (18).

Sera:

Thirty-three serum samples were obtained from AISBD patients with BP (n=5), MMP (n=22) and EBA (n=6). The diagnosis was made on clinical, histological and

immunological grounds. Clinical and histological features are listed in Table 1.

Signalments of these 33 AISBD dogs are listed in Table 2. For each animal serum, direct immunofluorescence testings demonstrated the presence of IgG and IgM and/or C3 at the dermal-epidermal junction.

Twenty serum samples from normal dogs were collected at the Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV) de l'Université de Montréal. These canine patients have been hospitalized for routine or post-traumatic procedures. Red blood count (RBC), white blood count (WBC), as well as proteins, globulins, creatinin and alanine transferase levels were all within normal ranges in all dogs.

Twenty serum samples were collected at the FMV from canine dermatological non AISBD patients. Blood samples have been collected on twenty successive patients on which a blood examination was required. Skin conditions, sex, age and breed of these dogs are listed in Table 3.

Antibodies:

The following antibodies have been used in this study

-Secondary antibodies:

- Anti-IgA: Fitc-Goat anti IgA Bethyl A40-104 F4. Dilution 1:50
- Anti-IgG: Fitc-Sheep antidiIgG-heavy chain spec. BethylA40-118F
Dilution:1:50
- Anti-IgM: Fitc-Goat anti IgM Bethyl A40 116 F11. Dilution 1:50
- Anti-IgE; Mouse anti canine IgE -Hammerberg 5.91, NC State
Univeristy, Raleigh, NC. Dilution 1:1000
- Anti-IgG-1: SN B6 mouse anti-canine IgG1 05 March 97
- Anti-IgG2: SN E5 mouse anti-canine IgG2 05 March 97

- Anti-IgG3: SN A3G6 mouse anti-canine IgG3 05 March 97
 - Anti-IgG4: SN A5 mouse anti-canine IgG4 05 March 97
- Anti-IgG1, Anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4 antibodies are gifts from MJ Day, U of Bristol, England and are used at a 1:10 dilution.

-Tertiary antibody (only in combination with anti IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE):

- Goat Antimouse IgG-Fitc (Whole molecule) Sigma F-0257.

Dilution 1:40

Indirect Immunofluorescence:

IIF were performed as previously described (6). Briefly, 5µm cryosections were obtained of each of the four substrates (two intact canine lips and two salt-split canine lips) and lied on glass slides, air dried for 10 minutes, acetone fixed for 10 minutes, rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and blocked in 1% normal goat serum solution for 20 minutes. Sections were then incubated for one hour with the patients sera (dilution 1:10) in moist chamber, then PBS rinsed.

Sections were then incubated for 30 (anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG) or 60 minutes (anti-IgE, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4) with the secondary antibodies at the dilutions listed above.

After incubation with the anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG secondary antibodies, sections were PBS rinsed, then mounted with Vectashield-DAPI and cover slipped.

After incubation with anti-IgE, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 and anti-IgG4 secondary antibodies, sections were incubated 30 minutes with the tertiary antibody then PBS rinsed, mounted with Vectashield-DAPI and cover slipped.

All the sections were then observed with an epifluorescence microscope.

Evaluation of the fluorescence:

The pattern of fluorescence exhibited by AISBD has been described elsewhere (6,7,8,17,18). Also it has been demonstrated that these patterns are easily observable on canine lip sections and canine salt-split lip sections (18). Based on these observations, a linear or slightly reticulated fluorescence at the dermal-epidermal junction, stronger than the dermal or epidermal one has been considered a positive result. It has also been checked, on salt-split sections, that this fluorescence occurs at the expected pole of the cleft, namely on the epidermal aspect for BP and MMP sera and on the dermal aspect for EBA sera.

Each section was evaluated for specific fluorescence. When contradictory results were observed between the same substrate of the two different dogs, the positive reaction was considered significant (18).

Each association of an antiglobulin and a serum was then scored positively or negatively. When fluorescence was observed at the first 1:10 dilution, titration was carried out, in order to determine an extinction dilution.

Immunoglobulin profiles and clinical/histological features:

Relationship between the immunoglobulin profiles and some clinical criteria has been investigated. A special attention has been paid to the following criteria: duration of the condition, severity of the condition (estimated by the number of affected mucous membranes, the percentage of affected body surface). Our attention was focused on MMP sera because it did not seem wise to generalize data resulting from the 5 and 6 sera testings from BP and EBA patients. MMP sera were then segregated in different groups depending on the positive or negative reaction to one specific antiglobulin. Mean values of each criteria were then evaluated for each group and compared to the mean value of the 22 MMP sera.

RESULTS

Demonstration of IgG:

IgG autoantibodies were demonstrated in 30/33 AISBD sera (Table 4). Eleven sera were positive at the initial 1:10 dilution and 19 were also positive at higher dilutions. IgG were demonstrated in 100% (5/5) of BP sera, 84% (5/6) of EBA sera and 86% (19/22) of MMP sera. When normal canine sera (n=20) and dermatological non AISBD canine sera (n=20) were tested, 10% (2/20) and 15% (3/20) sera yielded positive results respectively.

Demonstration of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4:

IgG1 and IgG4 autoantibodies were demonstrated in 88% (29/33) and in 42% (14/33) of the AISBD sera respectively. When more diluted sera were used, 14 sera were also positively reactive for IgG1 and 7 for IgG4. These IgG1 circulating antibodies were present in BP sera (5/5), EBA sera (5/6) and MMP (19/22). IgG4 antibodies were detected in BP sera (3/5), EBA sera (3/6) and MMP sera (8/22). On the other hand, very few sera were reactive when incubated with anti IgG2 (1/33) and anti IgG3 (4/33).

Demonstration of IgE, IgA and IgM:

It was not possible to demonstrate the presence of IgM circulating autoantibodies. Ten sera yielded positive results when challenged with anti IgA antibody. More interestingly, 73% (24/33) of sera demonstrated circulating IgE. These IgE were present in BP sera (2/5), EBA sera (4/6) and MMP (18/22). It was possible to assess these antibodies in diluted sera in only 5 cases.

Heterogeneity of the immunoglobulin profiles:

Most of the AISBD tested sera exhibited positive IgG results. On the other hand, the classes and subclasses of each particular case appeared unique and unpredictable. Most of the time, it was not possible to establish a relationship between one particular class or subclass and a particular clinical trait. However, when the number of affected mucous membranes of MMP patients was studied, an important difference between MMP patients sera with positive IgG4 reactions and all MMP patients sera was noticed (mean value 2.2 involved mucous membranes and 3.0 respectively).

DISCUSSION

The aim of the study was to determine the autoantibody profile of AISBD patients sera and to assess whether these autoantibodies exhibit a particular class and subclass distribution.

We have first demonstrated that most of these sera yielded positive results when challenged with anti-IgG antibodies. This result was expected and confirm previously reported ones (6,7,8). These positive results also contribute to validate our technique

and the choice of our substrates. Some sera did not exhibit positive results. It must however be kept in mind that we have used a 1:10 dilution as a first dilution. Some studies in man demonstrated 100% of positive results but used undiluted and even concentrated sera (19,20). One of these studies (19) stressed that tests are more rewarding when carried out on sera collected on non treated patients during an active episode of the disease. It was not possible to fulfill such conditions in our study.

We have also tested two sets of normal (n=20) and non AISBD dermatological patients (n=20) to assess that these autoantibodies do not occur with a high frequency in non-AISBD patients. In these two groups, it was not possible to establish a relationship between the age of the dogs and an increased frequency of specific IgG occurrence. Such a relationship has been established in man, with up to 19% of the elderly patients exhibiting specific circulating IgG (21). In our study, 12.5% (5/40) of tested sera exhibited positive results but all the dogs were middle-aged: 2/20 (10%) from normal dogs and 3/20 (15%) from non AISBD dermatological patients. Two sera came from patients that suffered from chronic pyoderma and one dog with generalized demodicosis. It may be hypothesized that chronic skin infection might stimulate non specifically the local immune system and yielded positive results. To our knowledge, such a relationship between a chronic infectious process and an increased frequency of false-positive results has not been established in man.

Once these steps completed, we have tested the AISBD sera with more specific antibodies. Our results suggest that IgG1 (29/33=88%) and IgE (24/33=73%), and, to a lesser extend IgG4 (14/33=42%) are the predominant classes and subclasses in AISBD sera. Some cases also exhibited positive results when challenged with anti-IgA antibodies (10/33 = 30%). Interestingly, these profiles seem to be grossly the

same in the three evaluated diseases (however any IgA were detected in the EBA group).

One veterinary study did not demonstrate IgA autoantibodies in the sera of dogs with MMP (8). Olivry et al. (7) detected significant levels of circulating anti-BMZ IgA and IgG autoantibodies in a dog with EBA. To our knowledge, it was the only veterinary studies that used IIF on AISBD patients sera in order to demonstrate autoantibodies from other classes than IgG.

In man, such studies have demonstrated the presence of IgE and IgA in BP patients sera (12,13), and IgA in MMP, BP and EBA patient sera (13,19,14).

Other studies have also demonstrated the presence of IgG1 and IgG4 in human MMP, EBA and BP patients (15,16). However, one of these studies suggested that IgG4 are more frequently encountered in MMP and EBA patients sera than IgG1 (15). The same study demonstrated that IIF is a less sensitive technique than immunoblotting for detecting IgG4 but not IgG1. We can therefore suppose than IgG4 may have been underestimated in our study. However, the other study (16) demonstrated IgG1 in 100% of the tested BP sera and IgG4 in 78% of the tested sera.

It was not possible to establish relationships between duration of the AISBD and one single IgG subclass or Ig class. The same statement as been made in man in a recent study on BP sera (16). The same study has however demonstrated a positive relationship between the positive IgG1 and IgG4 reaction and the duration of the disease. Such association did not appear in our study. It must however be underlined that the duration of the disease does not exactly describe the same things in man and in Dog. In man, duration of the disease is often associated with severity and resistance to treatment because it measures the elapsed time between occurrence and cure. In dog, duration of the disease describes the elapsed time between the first clinical signs

and the final diagnosis. In other words, prolonged duration of the disease may sometimes be associated with a milder condition, as some cases are not severe enough during the first months to warrant specialized dermatological consultation. It is then not wise to compare human and veterinary data on this particular point.

Severity may be better evaluated by the number of affected mucous membranes or the percentage of affected skin. Due to the small number of BP and EBA sera, we have limited our analysis to the MMP cases. It seems that a relationship may exist between IgG4 positive results and a less severe condition. In fact, sera that exhibited positive IgG4 fluorescence, have a mean value of 2.2 affected mucous membranes and the whole MMP group a mean value of 3 affected mucous membranes. It has been demonstrated in man that IgG1 are complement-fixing IgG and IgG4 are non complement-fixing IgG (16). It may be hypothesized that this non-fixing character of IgG4 confers protective rather than pathogenic activity to this subclass (16,22).

In man, numerous studies have been carried out to determine the relationship between disease severity and Ig classes and subclasses profiles. Their results appear somewhat contradictory. IgG4 increasing levels during the clinical process seem to be associated with remission in BP (22). IgE levels seem to decrease during a successful treatment of human BP (23). On the other hand specific IgE seem to be reactive mainly against the BP 230 antigen which is often considered non-pathogenic and not against the BP 180 (24). It has also been advocated that global IgG level determined by an NC16A specific Elisa method is correlated with the evolution of the BP disease (25). Setterfield et al. (26) also demonstrated that IgG and IgA levels are correlated with the activity of MMP. On the contrary, no relationship between IgG1 and IgG4 and EBA activity was revealed by another study (27). Most of these studies have been realized with serial titration. It is then possible to study the evolution of the titers and of the

classes and subclasses of Ig in the same patients during the clinical process and during the treatment. Such study has not ever been carried out in veterinary medicine. Comparisons and extrapolations may then be unwise.

Some other studies in man suggest that the clinical presentation may be linked to the Ig profile, namely the Ig profile of the ocular form of MMP is different from that of the other forms (28). Such correlation was not demonstrated by our own study.

Some further investigations are necessary to precise the relationships between Ig profile and clinical data in dogs. In particular, some preliminary studies have shown that a NC16A specific Elisa method may be rewarding in diagnosing AISBD in the dog. A study that uses such method could be very helpful to clarify and complete our data.

Canine AISBD may be clinically and sometimes histologically close to other ulcerative dermatoses such as pemphigus vulgaris, lupoid dermatoses, mucocutaneous pyoderma and, to a lesser extent, erythema multiforme and mycosis fungoides. Apart from pemphigus vulgaris, very little is known about the circulating Ig profiles of these conditions. A thorough determination of the circulating antibody profile of these clinically close conditions would be necessary to assess the real specificity of the IIF diagnosis of canine AISBD.

REFERENCES

1. Kunkle G, Goldschmidt MH, Halliwell REW. Bullous pemphigoid in a dog: a case report with immunofluorescent findings. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1978;14:52-57.
2. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yaspa SH : Characterization of Bullous Pemphigoid antigen : a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 1981; 24:897-903.
3. Labib RS, Anhalt JG, Patel HF, Mutsaim DF, Diaz LS. Molecular heterogeneity of the Bullous Pemphigoid antigen as detected by immunoblotting. *Journal of Immunology* 1986; 136:1231-1235.
4. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR. Identification of the skin basement membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *New England Journal of Medicine* 1984; 310: 1007-1013.
5. Bean SF. Cicatricial pemphigoid: immunofluorescence studies. *Archives of Dermatology* 1972; 106:552-555.
6. Iwasaki T, Olivry T, Lapierre JC, Chan LS, Peavey C, Liu YY, Jones JCR, Ihrke PJ, Woodley DT. Canine bullous pemphigoid (BP): Identification of the 180-kd canine BP antigen by circulating antibodies. *Veterinary Pathology* 1995;37:387-393.
7. Olivry T, Fine JD, Dunston SM, Chasse D, Tenorio AP, Monteiro-Riviere NA, Chen M, Woodley DT. Canine epidermolysis bullosa acquisita :

- Circulating autoantibodies target the aminoterminal (NC1) domain of collagen VII in anchoring fibrils. *Veterinary Dermatology* 1998;9:19-31.
8. Olivry T, Dunston SM, Schachter M, Xu L, Nguyen N, Marinkovich MP, Chan LS. A spontaneous model of mucous membrane (cicatricial) pemphigoid, an autoimmune blistering disease affecting mucosae and mucocutaneous junctions. *Journal of Autoimmunity* 2001;16(4): 411-421.
 9. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Immune mediated disorders. In: *Kirk and Muller's Small Animal Dermatology* WB. Saunders eds. Philadelphia. 2001: 670-671.
 - 10 Bystryn JC, Sabolinski M. Effects of substrate on indirect immunofluorescence tests for intercellular and basement membrane zone antibodies. *Journal of the American academy of Dermatology* 1986; 15: 973-977.
 - 11 Woodley DT, Sauder D, Talley MJ, Silver M, Grotendorst G, Qwarnstrom E. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. *Journal of Investigative Dermatology* 1983; 81: 149-153.
 12. Parodi A, Rebora A. Serum IgE antibodies bind to the epidermal side of the basement membrane zone splits in bullous pemphigoid (letter). *British Journal of Dermatology* 1992; 126: 526-528.
 13. Christophoridis S, Buedinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Herth M. IgG, IgA, IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *British Journal of Dermatology* 2000; 143(2): 349-355.

14. Lee CW. Serum IgA autoantibodies in patients with epidermolysis bullosa acquisita . *Dermatology Basel* 2000; 200: 83-84.
15. Bernard P, Prost C, Aucuturier P, Durepaire N, Denis F, Bonnetblanc JM. The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of investigative Dermatology* 1991; 97: 259-263.
16. Laffite E, Skaria M, Jaunin F, Tamm K, Saurat JH, Favre B, Borradori L. Autoantibodies to the extracellular and intracellular domain of bullous pemphigoid 180, the putative key autoantigen in bullous pemphigoid, belong predominantly to the IgG1 and IgG4 subclasses. *British Journal of Dermatology* 2001; 144: 760-768.
17. Iwasaki T, Shimuzu M, Obata M, Ogata M, Nagata M, Yanai T, Kitagawa H, Sasaki Y. Effect of substrate on indirect Imunofluorescence test for canine pemphigus foliaceus. *Veterinary Pathology* 1996;33:332-336.
- 18.Favrot C, Dunston S, Deslandes J, Paradis M, Olivry T. Effect of substrates selection on indirect immunoflorescence testing of canine autoimmune subepidermal blistering diseases. *The Canadian Journal of veterinary research* 2002, 65. In press.
19. Sarret Y, Hall R, Cobo LM, Thivolet J, Patton DL, Woodley DT. Salt-split human skin substrate for the immunofluorescent screening of serum from patients with cicatricial pemphigoid and a new method of immunoprecipitation with IgA antibodies. *Journal of the American association of Dermatology* 1991; 154: 952-958.
- 20.Korman NJ, Watson RD. Immune-mediated subepithelial blistering diseases of the mucous membranes: Improving the detection of circulating

- autoantibodies by the use of concentrated serum samples. *Archives of Dermatology* 1996; 132 (10) 1194-1198.
21. Hachisuka H, Kurose K, Karashima T, Mori O, Maeyama Y. Serum from normal elderly individuals contains anti-basement membrane zone antibodies. *Archives of Dermatology* 1996; 132 (10) 1201-1205.
22. Modre B, Allen J, Wojnarowska F. Does class switching contribute to remission in bullous pemphigoid? *Acta Dermatologica and Venerologica* 1999; 79: 127-131.
23. Doepp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Broecker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: Serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2000; 42 (4): 577-583.
24. Ghohestani-Reza F, Cozzani E, Delaporte E, Nicolas JF, Parodi A, Claudy A. IgE antibodies in sera from patients with bullous pemphigoid are autoantibodies preferentially directed against the 230-kDa epidermal antigen (BP230). *Journal of Clinical Immunology* 1998; 18 (3) 202-209.
25. Amo Y. Levels of anti-NC16A IgG determined by Elisa is correlated with the course of the disease. *Journal of Dermatological Science* 2001; 26(1): 14-18.
26. Setterfield J, Shirlaw PS, Bhogal BS, Tilling K, Challacombe SJ, Black MM. Cicatricial Pemphigoid: serial titres of circulating IgG and IgA antibasement membrane antibodies correlate with disease activity. *British Journal of Dermatology* 1999; 140(4):645-650.

27. Cho-Heun J, Lee-Il J, Kim-Soo C. Complement-fixing abilities of IgG subclasses of antibodies in Epidermolysis bullosa acquisita. *Yonsei Medical Journal* 1998; 39(4): 339-344.
28. Chan LS, Yancey KB, Hammerberg C, Soong HK, Regezi JA, Johnson K. Immune-mediated subepithelial blistering diseases of mucous membranes: pure ocular cicatricial pemphigoid is a unique clinical and immunopathological entity distinct from bullous pemphigoid and other subsets identified by antigenic specificities of antibodies. *Archives of Dermatology* 1993; 129: 448-455.

Disease	Bullous pemphigoid	Mucous membrane pemphigoid	Epidermolysis bullosa acquisita
Acquired	yes	yes	Yes
Erosive or bullous	yes	yes	yes
Involved areas	Skin	Mucous membranes	Skin and Mucous membrane
Subepidermal vesicles	yes	yes	yes
Cell infiltrate in dermis	Eosinophils, neutrophils	Cell-poor	neutrophils

Table 1. Inclusion criteria for AISBD canine patients

	Breed	Sex	Age onset (Year)
BP1	Marremano	F	0.5
BP2	Great Dane	NA	NA
BP3	Greyhound	F	4
BP4	Dalmatian	FS	1
BP5	Boxer	MC	3
EBA1	German shorthaired pointer	M	1
EBA2	Great Dane	F	0.5
EBA3	Labrador cross	M	4.5
EBA4	Great Dane	MC	1
EBA5	Doberman	F	1
EBA6	Afghan	FS	3
MMP1	Retriever	FS	4
MMP2	Welsh Springer spaniel	FS	4
MMP3	miniature Dachshund	M	8
MMP4	Cocker spaniel	M	10
MMP5	German shepherd	MC	3.5
MMP6	German shepherd	F	3.5
MMP7	Husky cross	MC	9
MMP8	German shepherd	MC	9
MMP9	Poodle	MC	5
MMP10	German shepherd	FS	8
MMP11	Husky cross	FS	3
MMP12	Labrador retriever	M	9
MMP13	Pomeranian	FS	4
MMP14	Greyhound	MC	8
MMP15	Border Collie	FS	2
MMP16	German shepherd	FS	11
MMP17	German shepherd	F	2
MMP18	Irish Setter	FS	7
MMP19	Border Collie cross	MC	7
MMP20	German shepherd	FS	4
MMP21	Dachshund	FS	15
MMP22	Collie cross	FS	2

Table 2. Data from the 33 AISBD canine patients.

NA=unknown, F= Female, M= Male, FS= Sterilized Female, MC= Castrated Male

BP= Bullous Pemphigoid, EBA= Epidermolysis Bullosa Acquisita

Dog	Breed	Sex	Age (year)	Skin condition
D1	Pomeranian	M	2	Alopecia X
D2	German shepherd	M	7	Perianal fistula
D3	German shepherd	F	3	Pyoderma
D4	German shepherd	M	4	Perianal fistula
D5	Chow-chow	M	4	Pyoderma
D6	Golden retriever	F	7	Hypothyroidism
D7	Golden retriever	M	7	Bacterial Folliculitis
D8	Welsh terrier	F	5	Bacterial Otitis
D9	Shih-Tzu	F	3	Demodicosis
D10	Belgian shepherd	F	1	Demodicosis
D11	Brittany spaniel	F	7	Pyoderma
D12	Pomeranian	M	7	Pyoderma
D13	Mongrel	M	6	Atopy
D14	Springer spaniel	M	6	Pyoderma
D15	Lhassa Apso	M	4	Pyoderma
D16	Mongrel	F	4	Systemic Lupus Erythematosus
D17	Labrador retriever	M	1	UlcerDematosis
D18	Pittbull	F	6	Cushing
D19	Samoyed	F	5	Alopecia X
D20	Mongrel	F	3	Pyoderma

Table3. Data from the dermatological canine non AISBD patients.

F= female, M= male

	Pos. 1 :10 only	Pos. >1 :10	Positive sera / Total sera (%)
IgA	7	3	10/33 (30%)
IgE	19	5	24/33 (72%)
IgG1	15	14	29/33 (88%)
IgG2	1	0	1/33 (3%)
IgG3	4	0	4/33 (12%)
IgG4	7	7	14/33 (42%)
IgG	11	19	30/33 (91%)
IgM	0	0	0/33 (0%)

AISBD sera

	Pos. 1 :10	Pos. >1 :10	Positive sera / Total sera (%)
IgA	3	0	3/5 (60%)
IgE	1	1	2/5 (40%)
IgG1	2	3	5/5 (100%)
IgG2	0	0	0/5 (0%)
IgG3	1	0	1/5 (20%)
IgG4	1	2	3/5 (60%)
IgG	0	5	5/5 (100%)
IgM	0	0	0/5 (0%)

Bullous Pemphigoid sera

	Pos. 1 :10	Pos. >1 :10	Positive sera / Total sera (%)
IgA	0	0	0/6 (0%)
IgE	3	1	4/6 (67%)
IgG1	2	3	5/6 (84%)
IgG2	0	0	0/6 (0%)
IgG3	1	0	1/6 (17%)
IgG4	1	2	3/6 (50%)
IgG	2	3	5/6 (84%)
IgM	0	0	0/6 (0%)

Epidermolysis bullosa acquisita sera

	Pos. 1 :10	Pos. >1 :10	Positive sera / Total sera (%)
IgA	4	3	7/22 (32%)
IgE	15	3	18/22 (82%)
IgG1	11	8	19/22 (86%)
IgG2	1	0	1/22 (5%)
IgG3	2	0	2/22 (9%)
IgG4	5	3	8/22 (36%)
IgG	9	10	19/22 (86%)
IgM	0	0	0/22 (0%)

Mucous Membrane Pemphigoid sera

Table 4. IIF testings results for AISBD sera. Isotypes of circulating auto-antibodies .
 Pos.1:10= number of sera that exhibit positive results at the 1:10 dilution only
 Pos.>1:10= number of sera that exhibit positive results at a greater dilution than 1:10
 (i.e. 1:25, 1:50.....)

Illustrations:

Figure 1. Canine salt-split lip; MMP serum; antibody : Anti-IgG1-Dilution 1 :25, x50

A well-demarcated fluorescence of the epidermal side of the cleft is present.

Figure 2. Canine intact lip; BP serum; Antibody : Anti-IgE- dilution 1 :10, x50

A reticulated fluorescence at the dermal-epidermal junction is present.

Figure 3. Canine salt-split lip; EBA serum; antibody : Anti-IgG-dilution 1 :10, x50

A thick fluorescence that extend within the *sublamina densa* of the dermis is present.

Figure 1.

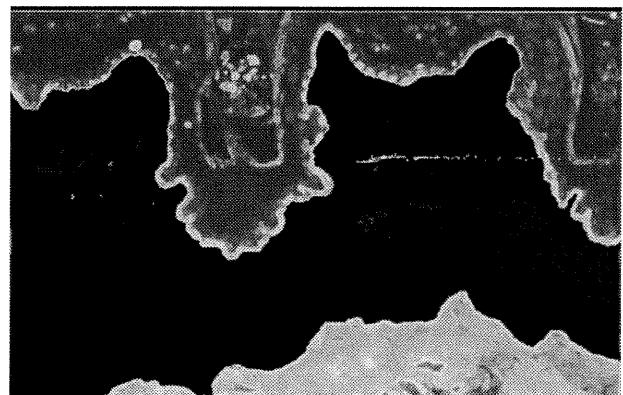


Figure 2.

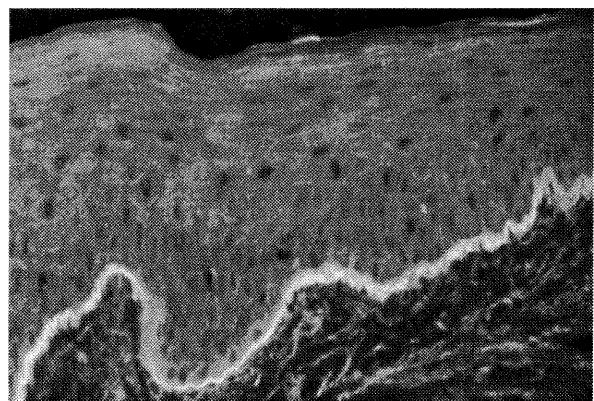
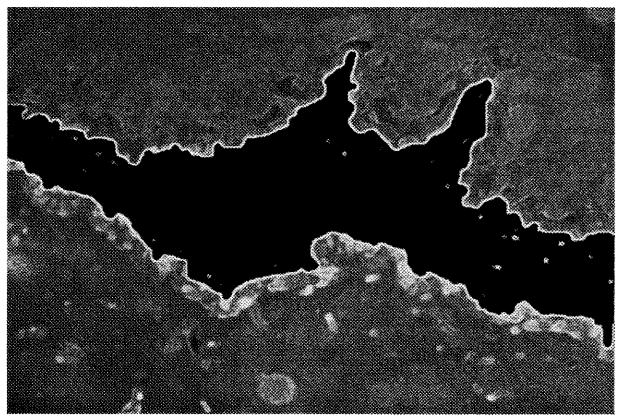


Figure3.



CHAPITRE CINQUIÈME:
DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

1. Les lèvres intactes et les lèvres clivées par le sel sont les meilleurs substrats canins pour le diagnostic par IFI des MAISEVB :

Les résultats présentés dans cette section ont été illustrés dans le chapitre 3, article n°1.

Les critères d'évaluation choisis nous ont amenés aux conclusions suivantes :

1. Il existe des variations importantes entre les résultats obtenus avec un même serum, un même type de substrat et un même anticorps anti IgG canin et ceci selon que le substrat est prélevé sur un chien-donneur ou sur un chien différent. Ce point nous amène à conclure qu'un biais important de l'IFI peut être de n'utiliser qu'un seul animal donneur, qui pourrait, en se montrant hyper-réactif contribuer à créer des résultats faussement positifs, ou bien, en se montrant peu réactif, contribuer à créer des résultats faussement négatifs. Ceci nous a amené, dans la suite de notre étude à associer systématiquement, sur une même plaque, les substrats provenant de deux chiens donneurs différents.
2. Les substrats provenant de peau, qu'elle soit dorsale ou ventrale, poilue ou glabre, clivée ou non par le sel, sont des substrats difficiles à utiliser pour plusieurs raisons :
 - Les coupes congelées sont difficiles à réaliser, l'épiderme, très fin, se détachant souvent du derme et les poils, lorsqu'ils sont présents, représentant pour le couteau un obstacle difficile à franchir.
 - La finesse de l'épiderme rend souvent difficile l'interprétation des fluorescences situées à la jonction dermo-épidermique. En effet, le derme d'une part et le *stratum corneum* d'autre part sont souvent l'objet d'une fluorescence

non spécifique qui sera difficile à distinguer de l'éventuelle fluorescence spécifique de la MB.

3. La langue canine s'est révélée un substrat facile à manipuler. Il a l'avantage de posséder un épithélium épais et homogène, rendant coupe et interprétation aisées. Il possède cependant un inconvénient majeur : le derme lingual présente souvent une fluorescence non-spécifique importante s'étendant souvent jusqu'au niveau de la MB et rendant la distinction entre fluorescence spécifique et non-spécifique difficile voire impossible.

4. La lèvre canine représente un excellent compromis, possédant à la fois la facilité de coupe, l'épaisseur épithéliale et la faible fluorescence d'arrière-plan qui en font le substrat de choix pour l'IFI destinée au diagnostic des MAISEVB.

2. Les IgG1, IgE et IgG4 sont les principaux isotypes d'auto-anticorps impliqués dans les MAISEVB :

Les résultats présentés dans cette section ont été exposés dans le Chapitre 4- Article n°2 du présent mémoire.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence les points suivants :

1. Les IgG sont présentes dans 91% des sérums de chiens atteints de MAISEVB lorsque l'on utilise pour première dilution de sérum 1 :10. Ces résultats sont légèrement inférieurs à certaines études humaines (23, 24) qui utilisent des sérums non dilués voire même concentrés, mais qui obtiennent des réponses positives dans 100% des cas. Dans notre étude, les IgG sont encore détectées dans 58% des sérums dilués au 1 :25. D'autre part, ces même IgG sont détectées dans 10 % des sérums de chiens normaux et 15% des chiens présentant des pathologies cutanées non-MAISEVB. Ces résultats peuvent être

comparés à une étude humaine portant sur des sujets normaux classés par tranche d'âge et visant à détecter par IFI les auto-anticorps circulants spécifiques de MAISEVB (37). Cette étude montrait que des patients âgés présentaient jusqu'à 19% de réponses positives alors que les patients jeunes ne présentaient jamais de réponses positives. Dans notre étude, tous les patients positifs étaient des animaux d'âge moyen (3-7ans) ce qui ne nous a pas permis de conclure à une influence quelconque de l'âge. Notons encore que seul un sérum parmi ces cinq présentait encore une fluorescence spécifique à la dilution de 1 :25. Il existait d'autre part peu de différences entre les trois différentes maladies étudiées, ce qui était attendu car les trois entités sont réputées pour présenter des IgG circulantes (2,3,4).

2. Les IgG1 ont été mises en évidence dans 88 % des cas avec des variations entre maladies peu importantes là encore (100% des cas de PB, 84% des cas d'EBA et 86 % des cas de PM). Les IgG1 ont été mises en évidence dans les trois pathologies chez l'homme. Bien que les données soient contradictoires, elles sont présentes dans plus de 85% des sérums de patients humains MAISEVB (29-32), certaines études faisant même état de 100%. Les IgG1 sont également présentes dans un nombre limité de sérums de chiens non MAISEVB (10%).
3. Les IgG4 ont été mise en évidence dans 42 % des cas de notre étude (60% des cas de PB, 50 % des cas de EBA, 36% des cas de PM). Ces chiffres, bien que significatifs sont inférieurs à bien des études humaines qui font état de pourcentages supérieurs (30,32). Modre et al. (31) considèrent même qu'il s'agit du principal auto-anticorps présent dans les cas de PB. Une étude suggère cependant que l'IFI serait moins sensible que l'immunoprécipitation

(ou immunobuvardage) pour la détection spécifique des IgG4 ce qui pourrait expliquer la modestie de nos résultats (29).

4. Les IgE ont été mises en évidence dans 72% (24/33) des cas de MAISEVB (40% des cas de PB, 67% des cas de EBA et 82% des cas de PM). Ce résultat est probablement le seul qui vienne contredire ce qui a pu être mis en évidence en médecine humaine. En effet, on considère généralement que les IgE ne sont présentes que chez les patients PB mais chez une vaste majorité de patients PB (27,30,32,33). Des investigations ultérieures devront confirmer (ou infirmer) cette particularité canine.
5. Les IgA ont été mises en évidence dans un nombre limité de cas , soit 30% (60% des cas de PB, 0% des cas d'EBA, 32% des cas de PM). Chez l'homme, les IgA ont été mises en évidence dans les trois pathologies (27,28,35). En revanche, la seule étude vétérinaire n'a pas pu mettre en évidence ces même IgA dans les sera des chiens PM. Là aussi, d'autres études seront nécessaires pour préciser ces données.
6. Les IgG3, IgG4, IgM ne sont pas ou peu mises en évidences dans les sérum des chiens MAISEVB. Ces données confirment celles de la dermatologie humaine.

3. Sensibilité et spécificité de l'IFI pour le diagnostic des MAISEVB :

Pour calculer ces valeurs, nous nous sommes basés sur les chiffres collectés durant l'étude sur la détermination des isotypes d'auto-anticorps circulants (Chapitre 4- article n°2). La majeure partie des données chiffrées utilisées ont donc déjà été citées précédemment : nous nous contenterons de les rappeler :

- IgG/ sérum de chiens atteints de MAISEVB-dilution 1 :10 :
30 sérum positifs sur 33 sera testés
- IgG/sérum de chien normaux-dilution 1 :10 :
2 sérum positifs sur 20 sera testés
- IgG/sérum de chiens souffrant d'un problème dermatologique non MAISEVB-dilution 1 :10 :
3 sérum positifs sur 20 sera testés
- IgG/sérum de chiens atteints de MAISEVB-dilution 1 :25 :
19 sérum positifs sur 33 sera testés
- IgG/sérum de chiens normaux + dermatologiques-dilution 1 :25 :
1 sérum positif sur 40 sérum testés
1 sérum positif sur 40 sérum testés.

De ces données nous pouvons déduire les valeurs suivantes :

- Sensibilité du dosage des IgG par IFI (dilution 1 :10) pour le diagnostic des MAISEVB : $30/33 = 91\%$
- Spécificité du dosage des IgG par IFI (dilution 1 :10) pour le diagnostic des MAISEVB : $35/40 = 88\%$
- Sensibilité du dosage des IgG par IFI (dilution 1 :25) pour le diagnostic des MAISEVB : $19/33 = 58\%$
- Spécificité du dosage de IgG par IFI (dilution 1 :25) pour le diagnostic des MAISEVB : $39/40 = 98\%$

Les résultats de notre étude sont à mettre en parallèle non seulement avec les études vétérinaires antérieures mais aussi avec des études de médecine humaine. L'IFI est traditionnellement considérée comme une méthode de faible sensibilité pour le diagnostic des maladies auto-immunes (MAI) chez le chien (19). Cependant, les études qui ont mené à ces assertions sont anciennes (17), basées sur un faible nombre de cas et elles n'utilisaient pas des substrats adaptés, en particulier des substrats clivés par le sel. En médecine humaine, au contraire, les études font le plus souvent état de sensibilité très élevées, égales et même supérieures à celle de notre étude. Lorsque des sensibilités de 100 % sont évaluées, il s'agit cependant d'études utilisant des sera non dilués voire concentrés en immunoglobulines (23, 24). Néanmoins, il est aujourd'hui couramment admis que l'IFI possède une sensibilité voisine de 90% dans le diagnostic de MAISEVB humaines. Il est cependant à noter que bien peu d'études évaluent la spécificité de cette méthode. L'une d'entre elles cependant (37), a montré que les auto-anticorps spécifiques étaient absents des sérum des humains jeunes normaux alors que leur présence pouvait être détectée chez 19 % des humains âgés normaux. Notre étude n'a pas réalisé de ségrégation par tranche d'âge mais il est à noter qu'aucun des chiens non atteints de MAISEVB qui ont montré des résultats positifs n'étaient des chiens âgés. On peut cependant, en extrapolant les données de l'étude précédemment citée, estimer la spécificité de la mise en évidence de IgG spécifiques par IFI dans les MAISEVB humaines à 90%, ce qui est proche de nos propres données. La deuxième série de données listées ci-dessus se rapporte aux dilutions de sérum à 1 :25. Cette dilution supérieure affecte considérablement la sensibilité de notre méthode (58%) mais améliore aussi beaucoup la spécificité (98%). Le choix de la dilution pourra donc dépendre du choix du clinicien, soit que celui-ci considère qu'il ne veut pas prendre le risque de ne pas diagnostiquer une pathologie

qui peut potentiellement être grave (choix d'une dilution faible, 1 :10), soit qu'il choisisse de ne pas prendre le risque de traiter avec des médicaments non dénués d'effets secondaires, un animal faussement diagnostiqué positif (choix d'une dilution plus élevée, 1 :25).

CONCLUSION

Notre étude nous a permis de démontrer que l'IFI avait plus que jamais sa place dans le diagnostic des MAI et, en particulier des MAISEVB, pour peu que des substrats adaptés soient utilisés. Nous n'avons en cela que poursuivi certains travaux vétérinaires (2-5) et de nombreux travaux humains (25-30). Notre étude a également permis de mieux cerner les possibilités de cette méthode en terme de sensibilités et de spécificités. Nous avons pu en cela confirmer que les données de la médecine humaine pouvaient être vérifiables chez le chien. Nous avons également pu déterminer les isotypes d'auto-anticorps spécifiques impliqués dans la pathogénie des MAISEVB canines. Les données que nous avons pu collecter se sont parfois rapprochées des données humaines (importance des IgG1 et IgG4, présence des IgA, importance des IgE dans la PB) mais ont parfois mis à jour des divergences inexplicquées (présence d'IgE chez les chiens atteints de PM et EBA, ce qui ne semble pas être le cas chez l'homme). L'ensemble de nos données mériterait donc d'être corroborées, soit en utilisant d'autres protocoles d'IFI, soit en utilisant d'autres techniques (ELISA, immunoprécipitation). De même, si nous avons pu estimer la spécificité de notre méthode, nous n'avons pas eu l'opportunité de vérifier le statut immunologique d'autres dermatoses pouvant partager avec les MAISEVB certaines présentations cliniques : nous pensons ici, en particulier, à certaines formes de lupus cutané (lupus discoïde) ou à la pyodermitite des jonctions muco-cutanées qui peut parfois ressembler à certaines formes bénignes de PM.

Les études humaines les plus récentes se sont attachées à corrélérer les profils immunologiques des patients avec le stade d'avancement de la maladie, son extension, sa réponse aux traitements, son caractère aigu ou, au contraire, chronique.

Les données qui ressortent de ces études sont encore contradictoires mais laissent néanmoins apparaître des tendances qui, si elles sont confirmées, pourraient faire de

l'IFI, non seulement un outil de diagnostic mais aussi, un outil pronostic et un outil de monitorage des patients atteints de MAISEVB. Des études de ce type ne sont probablement pas inenvisageables dans un avenir proche en médecine canine, au moins pour ce qui est de la plus fréquente des trois entités que nous avons étudié soit, la PM .

BIBLIOGRAPHIE

1. Kunkle G, Goldschmidt MH, Halliwell REW. Bullous pemphigoid in a dog: a case report with immunofluorescent findings. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1978;14:52-57.
2. Iwasaki T, Olivry T, Lapierre JC, Chan LS, Peavey C, Liu YY, Jones JCR, Ihrke PJ, Woodley DT. Canine bullous pemphigoid (BP) : identification of the 180-kDa Canine BP Antigen by circulating autoantibodies. *Veterinary Pathology* 1995; 32:387-393.
3. Olivry T, Dunston SM, Schachter M, Luting X, Nguyen N, Marinkovich MP, Chan LS . A spontaneous canine model of mucous membrane (cicatricial) pemphigoid, an autoimmune blistering disease affecting mucosae and mucocutaneous junctions. *Journal of Autoimmunity* 2001; 16(4): 411-421.
4. Olivry T, Fine JD, Dunston SM, Chasse D, Tenovio AP, Monteiro-Riviere NA, Chen M, Woodley DT. Canine epidermolysis bullosa acquisita: circulating autoantibodies target the aminoterminal non collagenous (NC1) domain of collagen VII in anchoring fibrils. *Veterinary Dermatology*. 1998; 9:19-31.
5. Olivry T, Dunston SM, Fahey M, Nguyen N, Marinkovich MP. Autoantibodies against the processed ectodomain of collagen XVII (BPAg2, BP180) define a canine homologue of linear IgA disease in Humans. *Veterinary Pathology* 2000; 37:302-309.
6. Lever WF :Pemphigus. *Medecine* 1953; 32:1-7.

7. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH: Characterization of Bullous Pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 1981; 24:897-903.
8. Labib RS, Anhalt JG, Patel HP, Mutsaim DF, Diaz LS. Molecular heterogeneity of the Bullous Pemphigoid antigen as detected by immunoblotting. *Journal of Immunology* 1986; 136:1231-1235.
- 9 . Bean SF. Cicatricial Pemphigus :immunofluorescence studies. *Archives of Dermatology* 1972; 106:552-555.
10. Lawley TJ, Strober W,Yaoita H, Katz SI. Small intestinal biopsies and HLA types in Dermatitis Herpetiformis patients with granular and linear IgA skin deposits. *Journal of Investigative Dermatology* 1980: 79: 9-14.
- 11.Woodley DT, Gammon WR, Briggaman RA. Chapter 66-*Epidermolysis Bullosa Acquisita*. In : Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Ed 5. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldschmidt LA, Katz SI & Fitzpatrick TB. V McGraw-Hill, New-York,1999. CD-Rom version
12. Woodley DT, Briggaman RA, O'keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR. Identification of the skin basement membrane autoantigen in Epidermolysis Bullosa Acquisita. *New England Journal of Medicine* 1984;310:1007-1013.
- 13 Stanley JR. Chapter 91-*Bullous pemphigoid*. In: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Ed 5. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldschmidt LA, Katz SI & Fitzpatrick TB.V. Mc Graw-Hill eds, 1999. CD-Rom version

14. Fleming TE, Kormann NJ. Cicatricial Pemphigoid. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2000;43 (4): 571-591.
15. Parodi A, Rebora A. Serum IgE antibodies bind to the epidermal side of the basement membrane zone splits in bullous pemphigoid (letter). *British Journal of Dermatology* 1992; 126:526-528.
16. Sutter MM, De Bruin A, Wyder M, WurmS, Credille K, Cranieri FM, Muller E. Autoimmunes diseases of domestic animals: an update. In Kwochka KW, Willemse T, Von Tscharner C. *Advances in veterinary dermatology III* Butterworth-Heinemann.Boston. 1998: 321.
17. Scott DW, Walton DK, Slater MR, Smith CA, Lewis RM. Immune-mediated dermatoses in domestic animals: Ten years after. *The Compendium of Continuing Education: Small Animal Practice* 1987; 9: 424-435.
- 18 Olivry T. Autoimmune subepidermal blistering dermatoses. Proceeding *Workshop on skin immunology*. Saint-Paul de Vence. 2000
19. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. *Diagnosis of immune-mediated skin diseases*. Chap 9. Muller and Kirk's Small animal dermatology VI. WB SAUNDERS co. Philadelphia .2000: 667-671.
20. Marinkovich P. The molecular genetics of basement membrane zone. *Archives of Dermatology* 1993;129:1557-1565.
21. Sarret Y. La jonction dermo-épidermique en 1995.in *Biologie de la peau* Edition INSERM.1995 : 57-77.
22. Olivry T. The epidermal basement membrane: From molecular biology to dermatological diseases. *ACVD residents' review*. Maui,1999.

23. Sarret Y, Hall R, Cobo LM, Thivolet J, Patton DL, Woodley DT. Salt-split human skin substrate for the immunofluorescent screening of serum from patients with cicatricial pemphigoid and a new method of immunoprecipitation with IgA antibodies. *Journal of the American association of Dermatology* 1991; 154: 952-958.
24. Korman NJ, Watson RD. Immune-mediated subepithelial blistering diseases of the mucous membranes: Improving the detection of circulating autoantibodies by the use of concentrated serum samples. *Archives of Dermatology* 1996; 132 (10) 1194-1198.
25. Bystryn JC, Sabolinski M. Effects of substrate on Indirect immunofluorescence tests for intercellular and basement membrane zone antibodies. *Journal of the American academy of Dermatology* 1986; 15: 973- 77.
26. Woodley DT, Sauder D, Talley MJ, Silver M, Grotendorst G, Qwarmstrom E. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. *Journal of Investigative Dermatology* 1983; 81: 149-53.
27. Christophoridis S, Buedinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Herth M. IgG, IgA, IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *British Journal of Dermatology* 2000; 143(2): 349-55.
28. Lee CW. Serum IgA autoantibodies in patients with epidermolysis bullosa acquisita . *Dermatology Basel* 2000; 200: 83-4.

29. Bernard P, Prost C, Aucuturier P, Durepaire N, Denis F, Bonnetblanc JM. The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and Epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of Investigative Dermatology* 1991; 97: 259-63.
30. Laffite E, Skaria M, Jaunin F, Tamm K, Saurat JH, Favre B, Borradori L. Autoantibodies to the extracellular and intracellular domain of bullous pemphigoid 180, the putative key autoantigen in bullous pemphigoid, belong predominantly to the IgG1 and IgG4 subclasses. *British Journal of Dermatology* 2001;144: 760-68.
31. Modre B, Allen J, Wojnarowska F. Does Class switching contribute to remission in bullous pemphigoid? *Acta Dermatologica and Venerologica* 1999;79: 127-31.
32. Doepp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Broecker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: Serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2000; 42 (4): 577-583.
33. Ghhestani-Reza F, Cozzani E, Delaporte E, Nicolas JF, Parodi A, Claudio A. IgE antibodies in sera from patients with bullous pemphigoid are autoantibodies preferentially directed against the 230-kDa epidermal antigen (BP230). *Journal of Clinical Immunology* 1998; 18 (3): 202-209.
34. Amo Y. Levels of anti-NC16A IgG determined by Elisa is correlated with the course of the disease. *Journal of Dermatological Science* 2001; 26(1): 14-18.

- 35.Setterfiled J, Shirlaw PS, Bhogal BS, Tilling K, Challacombe SJ, Black MM. Cicatricial Pemphigoid: serial titres of circulating IgG and IgA antibasement membrane antibodies correlate with disease activity. *British journal of Dermatology* 1999; 140(4): 645-50.
- 36.Iwasaki T, Shimuzu M, Obata M, Ogata M, Nagata M, Yanai T, Kitagawa H, Sasaki Y. Effect of substrate on indirect Imunofluorescence test for canine pemphigus foliaceus. *Veterinary Pathology* 1996;33: 32-336.
- 37.Hachisuka H, Kurose K, Karashima T, Mori O, Maeyama Y. Serum from normal elderly individuals contains anti-basement membrane zone antibodies. *Archives of Dermatology* 1996; 132 (10) : 1201-1205.