



HAL
open science

Performances des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 dans le diagnostic de pemphigoïde des muqueuses avec atteinte endobuccale stricte

Guillaume Rougier

► **To cite this version:**

Guillaume Rougier. Performances des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 dans le diagnostic de pemphigoïde des muqueuses avec atteinte endobuccale stricte. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03578152

HAL Id: dumas-03578152

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03578152v1>

Submitted on 17 Feb 2022

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

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

U.F.R. D'ODONTOLOGIE

Année 2022

Thèse n°19

THESE POUR L'OBTENTION DU

**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE
DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement

Par ROUGIER, Guillaume

Né(e) le 29/08/1989 à Arcachon 33120

Le 03/02/2022

**Performances des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 dans le diagnostic de pemphigoïde
des muqueuses avec atteinte endobuccale stricte.**

Sous la direction du Professeur Jean-Christophe FRICAIN

Membres du jury :

M. CATROS Sylvain
M. SAMOT Johan
M. FRICAIN Jean-Christophe
Mme ARRIVE Elise
Mme FENELON Mathilde

Professeur des universités
Maître de conférences des universités
Professeur des universités
Maître de conférences des universités
Maître de conférences des universités

Président
Rapporteur
Directeur
Examineur
Examineur

UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ
01/09/2021

Président M. TUNON DE LARA Manuel
Directeur de Collège des Sciences de la Santé M. PELLEGRIN Jean-Luc

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES

Directrice Mme BERTRAND Caroline 58-01
Directeur Adjoint à la Pédagogie Mr DELBOS Yves 56-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche M. CATROS Sylvain 57-01
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales M.SEDARAT Cyril 57-01

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Sylvain	CATROS	Chirurgie orale	57-01
M	Raphaël	DEVILLARD	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-01
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques - Biomatériaux	58-01
M.	Jean-Christophe	FRICAÏN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Cécile	BADET	Biologie Orale	57-01
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-01
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01
M.	Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M,	Jean-Christophe	COUTANT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M,	Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Mathilde	FENELON	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Dominique	GILLET	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01

M.	Adrien	NAVEAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Johan	SAMOT	Biologie Orale	57-01
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Noëlle	THEBAUD	Biologie Orale	57-01
M.	Eric	VACHEY	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01

AUTRES ENSEIGNANTS

M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-01
M	Pierre-Hadrien	DECAUP	Prothèse dentaire	58-01

ASSISTANTS

M.	William	AUMAILLEY	Prothèse dentaire	58-01
M.	Bastien	BERCAULT	Chirurgie Orale	57-01
M.	Baptiste	BERGES	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Virginie	CHUY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Diane	DELADRIERE	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M	Quentin	DESPERIEZ	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Laura	DONNET	Biologie Orale	57-01
Mme	Julia	ESTIVALS	Odontologie pédiatrique	56-01
Mme	Laurie	FUCHS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Paul	GIRARDEAU	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mr	Pierre-André	GUILLAUD	Parodontologie	57-01
Mme	Jane	GOURGUES	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mr	Louis	HUAULT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Mathilde	JACQUEMONT	Parodontologie	57-01
Mr	Aymeric	JOUBERT DU CELLIER	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mr	Jean-Baptiste	IRIBARREN	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Claudine	KHOURY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Camille	LACAULE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Antoine	LAFITTE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Xavier	LAGARDE	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Mathilde	LEVRIER	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Léa	MASSE	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Chiara	PASCALI	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Rawen	SMIRANI	Parodontologie	57-01
Mme	Florianne	VILLAT	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Clément	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

Remerciements

A mon Président de thèse

Monsieur le Professeur Sylvain CATROS

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Section Chirurgie Orale 57-01

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider cette thèse.

Je vous suis très reconnaissant pour votre pédagogie et votre enseignement tout au long de cette formation.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A mon Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Christophe FRICAIN

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Chirurgie buccale – Pathologie et Thérapeutique 57-01

Merci pour le privilège que vous m'avez fait en acceptant de diriger ce travail.

Je vous remercie également pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté, ainsi que pour votre disponibilité lors de l'élaboration de ce travail.

Je vous suis également reconnaissant pour m'avoir transmis le goût de votre discipline passionnante, et ce, tout au long de ma formation. Voyez en l'accomplissement de ce travail le témoignage de mon profond respect.

A mon Rapporteur de thèse

Monsieur le Docteur Johan SAMOT

Docteur de l'Université de Bordeaux – Mention Sciences Biologiques et Médicales – Option
Sciences Odontologiques

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je souhaite vous exprimer toute ma reconnaissance pour vos précieux conseils tout au long de ma formation.

Veillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

A mon Assesseur

Madame le Docteur Elise ARRIVE

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Section Prévention épidémiologie - Economie de la santé - Odontologie légale

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Je souhaite vous exprimer ma gratitude pour vos enseignements.

A mon Assesseur

Madame le Docteur Mathilde FENELON

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Chirurgie Orale 57-01

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de bien vouloir juger ma thèse.

Permettez-moi de vous exprimer ma vive reconnaissance.

A tous mes enseignants rencontrés au cours de ma formation

Je vous remercie sincèrement pour votre désir de partager votre connaissance, et pour votre enseignement clinique tout au long de ma formation. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

A mes parents

Merci pour votre confiance et votre soutien sans faille tout au long de ces études et tout au long de ma vie, pour vos précieux conseils et surtout votre amour.

A ma sœur, à mon frère et à mon petit neveu

Aurélie, Mathieu, Hadrien, merci pour votre soutien et votre bienveillance depuis toujours, et merci pour tous ces bons moments de complicités passés avec vous depuis mes débuts.

A mes grand-mères

Merci de votre présence bienveillante et de votre amour inconditionnel depuis mes premiers instants. Je pense très fort à vous.

A Mathilde

Tu as ma plus profonde admiration et tout mon amour. Merci d'être à mes côtés chaque jour.

A mes amis

Alex, merci pour tous ces rires, pour tous ces bons moments, ces combines, ces aventures racontées. Et merci pour ta présence jusque dans les pays de l'extrême. Indiana Jones.

Nathan, pour toutes ces franches rigolades, ces innombrables bars, cette joie de vivre depuis le début. Merci pour tout.

Raph, merci pour tous ces rires, ces sessions surf, ces moments pépites passés au cours de ces études, et qui je l'espère perdureront encore un bon moment.

Julien, merci pour tous ces moments passés depuis les stages de médecine aux USIC. Depuis nos voies ont légèrement divergé, mais la symphonie n°9 perdurera toujours. Merci mon Ju.

Guillaume et Tristan, mes piliers depuis le lycée, pour tous ces moments d'amitiés et de franche camaraderie vécus avec vous, je vous remercie.

Martin, Grégoire, Thomas, Hamza, Romain, Julien, Richard, Flavie, Paul, Idriss, Boubiax, Melvin, Sophie, Anna, et tous les autres.

Merci d'avoir rendu ces années d'études encore plus belles grâce à vous.

A ma famille

Merci pour ces moments de partage. Veuillez trouver ici la marque de mon affection.

Table des matières

Remerciements.....	4
Table des matières.....	12
Acronymes et abréviations.....	14
Table des figures.....	15
Table des tableaux.....	15
Introduction.....	16
1.1 Généralités sur les dermatoses bulleuses auto-immunes.....	16
1.1.1 Définition.....	16
1.1.2 Immunopathologie.....	17
1.1.2.1 Rappels sur les systèmes de cohésion en lien avec les DBAI.....	17
1.1.2.2 Les cibles antigéniques impliquées dans les DBAI.....	21
1.1.3 Diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes.....	22
1.1.3.1 L'immunofluorescence directe.....	23
1.1.3.2 L'immunofluorescence indirecte.....	23
1.1.3.3 Les tests ELISA.....	23
1.1.3.4 L'immunoblot.....	24
1.1.3.5 L'immunomicroscopie électronique.....	24
1.2 La pemphigoïde des muqueuses.....	24
1.2.1 Définition.....	24
1.2.2 Description clinique.....	25
1.2.2.1 Caractéristiques cliniques des pemphigoïdes des muqueuses.....	25
1.2.2.2 Les différentes formes cliniques de pemphigoïde des muqueuses.....	30
1.2.3 Diagnostic positif de pemphigoïde des muqueuses.....	31
1.2.3.1 Examen histologique.....	31
1.2.3.2 Examen par immunofluorescence directe.....	32
1.2.3.3 Examen par immunofluorescence indirecte.....	33
1.2.3.4 Les tests ELISA.....	33
1.2.3.5 L'immunomicroscopie électronique.....	34
1.2.4 Diagnostics différentiels des pemphigoïdes des muqueuses.....	34
1.2.5 Prise en charge des pemphigoïdes des muqueuses.....	36
1.2.5.1 Objectifs.....	36
1.2.5.2 Prise en charge en odontologie.....	36
1.2.5.3 Prise en charge médicale.....	37
Matériel et Méthode.....	39
2.1 Rappel des objectifs de l'étude.....	39

2.2	Type d'étude	39
2.3	Population de l'étude	39
2.4	Les tests ELISA	40
2.5	Source et archivage des données.....	40
2.6	Analyse statistique	41
Résultats	42
3.1	Population étudiée.....	42
3.2	Analyse des performances diagnostiques	42
Discussion	45
4.1	Discussion des résultats	45
4.1.1	La population étudiée.....	45
4.1.1.1	Sex ratio	45
4.1.1.2	Âge au moment du diagnostic	45
4.1.2	Efficacité des tests ELISA	45
4.2	Principales forces de l'étude	47
4.3	Limites de l'étude.....	47
Conclusion	48
Bibliographie	49
Annexe : Protocole ELISA Euroimmun ®	52
Résumé	63
Abstract	63
Mots clés	63

Acronymes et abréviations

Ac : Anticorps
ADBAI : Autre dermatose bulleuse auto-immune
Ag : Antigène
BP180 : Bullous pemphigoid 180
BP230 : Bullous pemphigoid 230
BPAg1 : Bullous pemphigoid antigen 1
BPAg2 : Bullous pemphigoid antigen 2
C3 : Protéine du complément numéro 3
DBAI : Dermatose bulleuse auto-immune
DIgAL : Dermatose à IgA linéaire
DSG1/DSG3 : Desmogléine 1/ Desmogléine 3
EBA : Epidermolyse bulleuse acquise
ELISA : Enzyme-linked Immunosorbant Assay
EVA : Echelle visuelle analogique
EP : Erythème polymorphe
ET : Ecart-type
FN : Faux négatifs
FP : Faux positifs
IFD : Immunofluorescence directe
IFI : Immunofluorescence indirecte
Ig (A/G/M) : Immunoglobuline (A/G/M)
IME : Immunomicroscopie électronique
JCE : Jonction chorio-épithéliale
JDE : Jonction dermo-épidermique
LPP : Lichen plan pemphigoïde
MB : Membrane basale
NC16A : Non collagenous 16 A
PB : Pemphigoïde bulleuse
PE : Polynucléaire éosinophile
PM : Pemphigoïde des muqueuses
PN : Polynucléaire neutrophile
PV : Pemphigus vulgaire
Se : Sensibilité
SIC : Substance inter-cellulaire
Sp : Spécificité
VN : Vrais négatifs
VP : Vrais positifs
VPN : Valeur prédictive négative
VPP : Valeur prédictive positive

Table des figures

Figure 1 : Organisation moléculaire du desmosome [9].....	18
Figure 2 : Organisation moléculaire de la jonction dermo-épidermique. [12]	19
Figure 3 : Organisation schématique des principales cibles antigéniques reconnues dans les dermatoses bulleuses auto-immunes (Humbel RL. (2003) Autoanticorps et autoantigènes de la peau. GEAI l'info n°6 octobre 2003 page 4).....	21
Figure 4 : Ulcérations à contours érythémateux au niveau du palais dur, chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain)	26
Figure 5 : Bulle muqueuse chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain)	26
Figure 6 : Bulles muqueuses, à contours érythémateux, chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain).....	27
Figure 7 : Erosions / ulcérations chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain)	27
Figure 8 : Gingivite érosive avec atteinte diffuse de la gencive au maxillaire (JC Fricain).....	28
Figure 9 : Décollement par traction de l'épithélium gingival lors du test de la pince (JC Fricain)..	28
Figure 10 : Défaut d'hygiène entraînant une accumulation de plaque bactérienne dans la gingivite érosive (JC Fricain).....	29
Figure 11 : Atteinte cutanée de la pemphigoïde des muqueuses : érosion du cuir chevelu et cicatrice chronique (JC Fricain)	30
Figure 12 : Examen histologique d'une biopsie de muqueuse buccale révélant la présence d'une séparation bulleuse sous épithéliale. (JC Fricain).....	31
Figure 13 : Anticorps anti-membrane basale mis en évidence par immunofluorescence directe.....	32
Figure 14 : Etude par microscopie électronique d'une lésion cutanée montrant une destruction focale de la lamina densa au niveau de la membrane basale [17].....	34
Figure 15 : Diagramme résumé de l'étude.....	44

Table des tableaux

Tableau 1 : Eléments du diagnostic des différentes maladies bulleuses auto-immunes [1].....	22
Tableau 2 : Eléments du diagnostic différentiel des pemphigoïde des muqueuses [17]	35
Tableau 3 : Données démographiques de la population de l'étude	42
Tableau 4 : Performances diagnostiques des tests ELISA dans la PM.....	43

Introduction

Les dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) représentent un groupe de maladies peu fréquentes, liées à la production d'anticorps dirigés contre les systèmes de jonction de la peau et des muqueuses. Elles sont caractérisées par la présence de bulles et d'érosions/ulcérations sur la peau et/ou les muqueuses. [1] Il existe un nombre relativement important de sous-types de DBAI dont les pemphigus, la pemphigoïde bulleuse (PB), la pemphigoïde des muqueuses (PM), l'épidermolyse bulleuse acquise (EBA), la dermatose à IgA linéaire (DIgAL), et le diagnostic différentiel peut se révéler difficile simplement à partir du tableau clinique. Le diagnostic de DBAI repose donc sur une suspicion clinique ainsi que sur la mise en évidence d'anticorps dirigés contre des structures de la peau et/ou des muqueuses. [2,3] La détection de certains autoanticorps en IFD est l'examen gold standard, cependant les tests sérologiques utilisant un procédé immuno-enzymatique (ELISA) sont de plus en plus utilisés en routine dans le diagnostic des DBAI [4].

Contrairement à la pemphigoïde bulleuse [5-8], peu de données existent dans la littérature concernant les performances des tests ELISA dans le diagnostic de pemphigoïde des muqueuses avec atteinte buccale stricte. L'objectif de cette étude était d'évaluer la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et négative des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 dans la pemphigoïde des muqueuses avec atteinte buccale exclusive.

1.1 Généralités sur les dermatoses bulleuses auto-immunes

1.1.1 Définition

Les **dermatoses bulleuses auto-immunes** (DBAI) représentent un groupe hétérogène de maladies auto-immunes, peu fréquentes et de pronostic variable, parfois sévère. Elles sont secondaires à la présence d'**auto-anticorps** dirigés contre différents constituants de la peau et/ou des muqueuses : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique (JDE) ou le derme superficiel. La conséquence clinique de ces pathologies est la formation de bulles au niveau cutané ou bien au niveau des muqueuses [1]

On distingue deux grands groupes de DBAI, en fonction du site de clivage [9] :

- Les **dermatoses bulleuses auto-immunes intra-épidermiques**, qui se caractérisent par une perte de cohésion inter-cellulaire, résultant de l'altération d'un ou de plusieurs constituants des **desmosomes** par les auto-anticorps. Les maladies correspondantes sont les **pemphigus**.

- Les **dermatoses bulleuses auto-immunes sous-épidermiques**, qui nous intéressent particulièrement dans ce travail, sont caractérisées par la perte de l'adhésion entre le derme et l'épiderme, résultant d'une altération d'un ou plusieurs composés de la **jonction dermo-épidermique** par les auto-anticorps. Les maladies correspondantes sont les **pemphigoïdes**.

1.1.2 Immunopathologie

1.1.2.1 Rappels sur les systèmes de cohésion en lien avec les DBAI

1.1.2.1.1 Les desmosomes [9]

Les desmosomes sont les complexes majeurs de l'adhésion entre les kératinocytes. Ils sont constitués :

- De protéines transmembranaires appelées cadhérines : ce sont les desmoglénines (DSG) 1 et 3 et les desmocollines.
- De composants cytoplasmiques : la desmoplakine, la plakoglobine, la plakophiline, et l'envoplakine, qui forment la plaque desmosomale cytoplasmique.

Les domaines extracellulaires des cadhérines desmosomales permettent l'adhésion intracellulaire et leurs domaines intracellulaires les relient aux filaments des cytokératines (Figure 1)

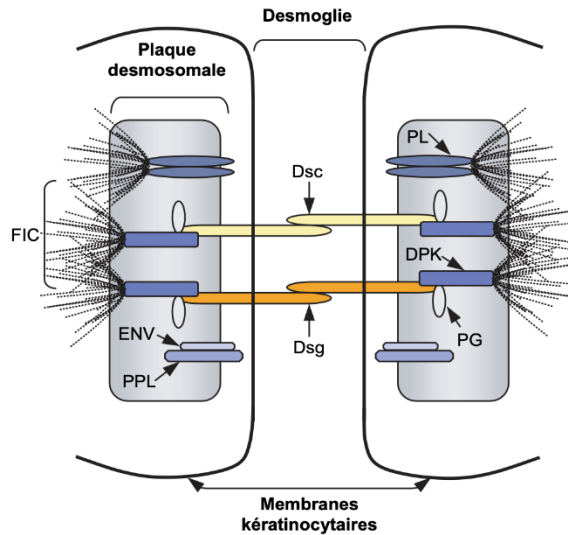


Figure 1 : Organisation moléculaire du desmosome [9]

Légende : Dsg : Desmogléine, DSC : Desmocolline, DPK : Desmoplakine, ENV : Envoplakine, FIC : Filaments intermédiaires de cytokeratine, PG : Plakoglobine, PL : Plakophiline

1.1.2.1.2 La jonction dermo-épidermique [9-11]

Cette région représente un continuum anatomique et macromoléculaire complexe, constitué de protéines issues des kératinocytes de l'épiderme (ou de l'épithélium muqueux), et des fibroblastes du derme (ou du chorion muqueux), qui forment un réseau fonctionnel de protéines fibrillaires et de glycoprotéines permettant une adhésion stable de l'épithélium de surface au derme sous-jacent. Elle permet donc l'adhérence du derme à l'épiderme. Son équivalent au niveau des muqueuses est la **jonction chorio-épithéliale (JCE)**.

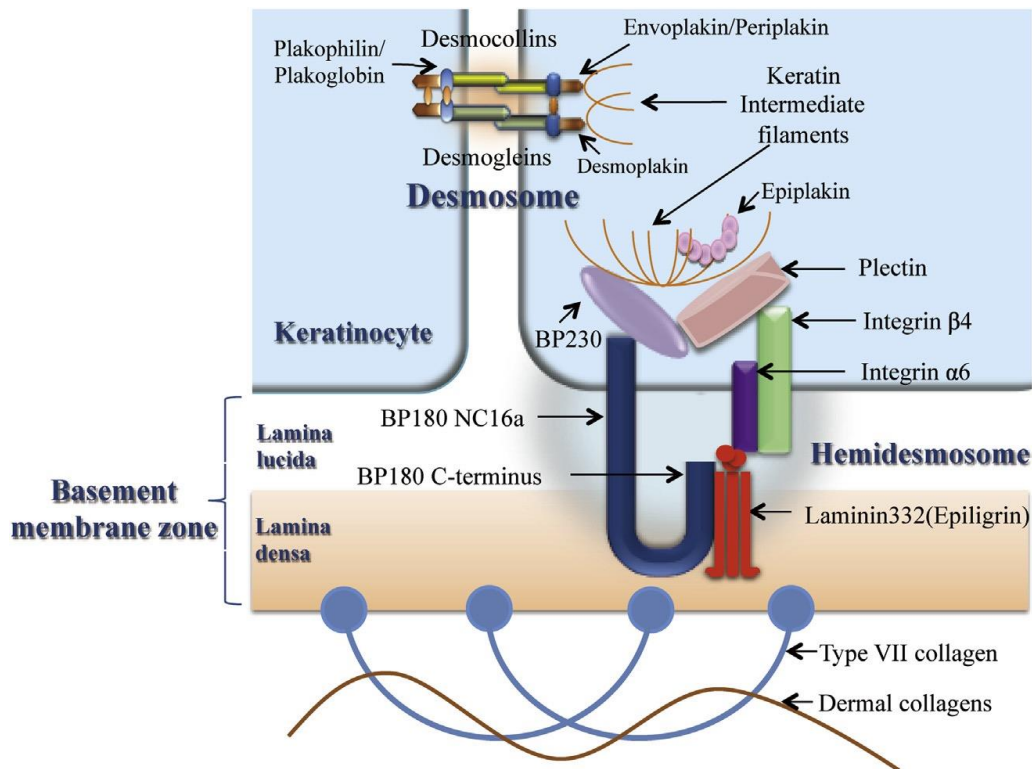


Figure 2 : Organisation moléculaire de la jonction dermo-épidermique. [12]

Elle est constituée de plusieurs zones distinctes (Figure 2) :

- Les **hémidesmosomes**, ce sont des structures complexes d'attache des kératinocytes basaux à la membrane basale qui contiennent plusieurs protéines importantes :
 - La **plectine** et la protéine **BP230**, ou BPAG1, composants majeurs de la plaque hémidesmosomale dont la fonction est d'assurer l'appariement aux filaments de kératine des cellules de l'épiderme, ainsi que l'ancrage de ces cellules à la lame basale par connection avec les filaments d'ancrage
 - **BP180**, ou BPAG2 ou collagène XVII, qui est protéine trans-membranaire, avec une extrémité N-terminale intracellulaire et une extrémité C-terminale qui se prolonge dans la lamina lucida. Le domaine NC16A, immédiatement juxta-

membranaire, est la cible majeure des anticorps anti-BP180 dans la pemphigoïde bulleuse (PB) et dans la PM. [9]

- **La membrane basale**, constituée de deux couches :
 - la lamina **lucida**, claire en microscopie électronique, qui renferme l'**intégrine $\alpha 6\beta 4$** . C'est une protéine trans-membranaire, formée de 2 sous unités, qui fait le lien entre la plaque hémidesmosomale et la lamina densa, via la laminine 5.
 - la lamina **densa**, dense aux électrons, qui renferme la **laminine 5**

- **Les fibrilles d'ancrage**, constituées en grande majorité de **collagène VII**, qui permettent la cohésion entre le derme et la membrane basale.

Tous ces constituants sont fortement antigéniques et peuvent être la cible d'auto-anticorps dans les DBAI sous-épidermiques. [11]

1.1.2.2 Les cibles antigéniques impliquées dans les DBAI

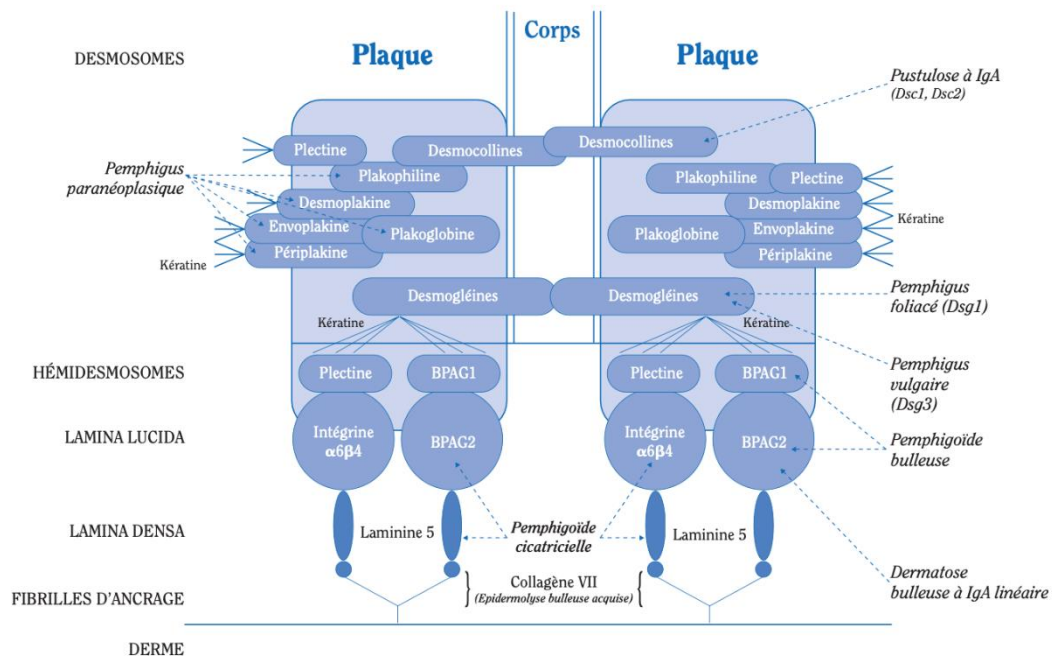


Figure 3 : Organisation schématique des principales cibles antigéniques reconnues dans les dermatoses bulleuses auto-immunes (Humbel RL. (2003) Autoanticorps et autoantigènes de la peau. GEAI l'info n°6 octobre 2003 page 4)

Les DBAI regroupent ainsi plusieurs pathologies qui possèdent chacune des cibles antigéniques identifiées et qui peuvent être détectées au laboratoire par certaines techniques immunologiques. Celles-ci sont résumées dans la Figure 3.

Cependant, il n'a pas été démontré qu'il y ait une spécificité absolue vis-à-vis d'une dermatose bulleuse donnée. [13]

1.1.3 Diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes

Le diagnostic est d'abord clinique, avec la recherche de lésions bulleuses au niveau de la peau et/ou des muqueuses, puis histologique, avec la localisation de la lésion bulleuse au sein des tissus, et enfin il est confirmé grâce à la détection d'auto-anticorps par différentes méthodes de laboratoire.

Les éléments diagnostics sont rassemblés dans le tableau suivant.

Maladie	Contexte	Lésion élémentaire	Prurit	Signes associés	Atteinte des muqueuses	Diagnostic	Traitement
Dermatite herpétiforme	Maladie cœliaque connue ou pas, enfants, adultes jeunes	Vésicules ou excoriations peu spécifiques	++ (premier symptôme)	Pas de signe de Nikolsky*	0	Biopsie avec IFD Anticorps anti-transglutaminase, anti-endomysium	Régime sans gluten Disulone Réponse fréquente
Dermatose à IgA linéaire	Enfants surtout, adultes : origine médicamenteuse (vancomycine)	Bulle tendue sur peau saine ou urticarienne (atteinte du siège chez l'enfant)	+	Pas de signe de Nikolsky*	Rare chez enfant Possible chez adulte	Biopsie avec IFD	- Arrêt si médicament inducteur - Disulone ou corticoïdes per os
Épidermolyse bulleuse acquise	Adulte	Bulle en peau saine (zones de frottement ++)	0	Kystes milium	Fréquente	Biopsie avec IFD, IME directe	Immunosuppresseurs +/- corticoïdes
Pemphigoïde de la grossesse (pemphigoïde gestationis)	Grossesse 2 ^e ou 3 ^e trimestre	Bulle sur fond érythémateux (abdomen : péri-ombilicale)	+++	Plaques urticariennes (abdomen)	0	Biopsie avec IFD AC anti-BPAG2 (ELISA)	Dermocorticoïdes -des +/- corticoïdes per os
Pemphigoïde bulleuse	Sujets âgés Association maladies neurologiques grabatantes (démence, AVC, M de Parkinson)	Bulle tendue lésions urticariennes	+++ parfois initial	Pas de signe de Nikolsky* Parfois : lésions purement urticariennes ou eczématiformes	Rare	Biopsie avec IFD Anticorps sériques anti-peau* (IFI et ELISA anti-BPAG1-2)	Dermocorticoïdes seuls Rarement : corticoïdes per os ou immunosuppresseurs
Pemphigoïde cicatricielle Syn : pemphigoïde des muqueuses	Sujets âgés	Synechies oculaires Érosions buccales (dysphagie) ou génitales Évolution cicatricielle	0	Atteinte cornée, pharynx, œsophage	Prédominante	Biopsie avec IFD IME	Disulone Immunosuppresseurs, +/- corticoïdes per os
Pemphigus	Contexte d'auto-immunité	Bulle flasque sur peau saine Érosions buccales, dysphagie +++	0	Signe de Nikolsky*	Au cours du pemphigus vulgaire	Biopsie avec IFD Anticorps sériques anti-peau* (IFI et ELISA anti-desmoglénines)	Corticoïdes oraux Immunosuppresseurs

Tableau 1 : *Éléments du diagnostic des différentes maladies bulleuses auto-immunes [1]*

Légende : AC : Anticorps, AVC : Accident Vasculaire Cérébral, BPAG1 : Bullous pemphigoid Antigen 1, BPAG2 : Bullous pemphigoid Antigen 2 IFD : Immunofluorescence directe, IFI : Immunofluorescence indirecte, IME : Immunomicroscopie électronique, M : Maladie

Nous allons nous intéresser dans ce travail aux examens diagnostics faisant appels à des techniques immunologiques.

1.1.3.1 L'immunofluorescence directe

C'est le **gold standard** pour le diagnostic des DBAI. [14] C'est une technique qui permet de révéler, au microscope optique, un dépôt d'anticorps au niveau de la membrane basale, à partir de biopsies de peau ou de muqueuse péri-lésionnelle. Les prélèvements sont adressés au laboratoire d'anatomie pathologique, congelés, ou bien conservés dans du milieu de Michel. Les antigènes recherchés sont les auto-anticorps de type IgG, IgM, IgA, et des anticorps dirigés contre certaines parties du complément (C3), se fixant sur des protéines d'ancrage au sein de la peau et/ou des muqueuses. Ils sont marqués par un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène recherché.

1.1.3.2 L'immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte (IFI) se réalise sur divers substrats qui présentent les antigènes.

C'est une méthode permettant de détecter la présence d'auto-anticorps anti-membrane basale présents dans le sérum du patient, qui se lient aux antigènes présents sur le substrat.

La membrane basale est clivée artificiellement sur les substrats afin d'exposer ses 2 versants (cela permet de recréer artificiellement une bulle). [15] Les dépôts immuns se font soit sur le toit de la bulle, soit sur le plancher de la bulle, soit sur les deux. Il existe différents substrats dont le choix se fera en fonction de la DBAI suspectée.

1.1.3.3 Les tests ELISA

Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immune-enzymatique qui permet d'identifier, de doser et de détecter la présence d'auto-anticorps dirigés contre des cibles antigéniques présentes dans le sérum. Pour cela, il faut connaître la protéine cible (par exemple : BP180, Ag viral, etc.) pour permettre son isolement. On l'incube dans des puits avec le sérum du patient. Puis à l'aide d'anti-anticorps, on détecte la présence ou non d'anticorps spécifiques de cette protéine contenus dans le sérum.

Dans les DBAI, des kits ELISA permettent de détecter, **en routine**, des auto-anticorps anti-desmogléine 1, desmogléine 3, et anti-envoplakine dans les pemphigus, et **anti-BP180, anti-BP230** et anti-collagène VII dans les pemphigoïdes. [14]

1.1.3.4 L'immunoblot

C'est une technique qui n'est pas réalisée en routine. Elle permet de détecter des anticorps circulants et de caractériser le poids moléculaire de l'antigène cutané contre lequel sont dirigés ces anticorps. Elle est beaucoup utilisée en recherche pour trouver de nouveaux antigènes.

1.1.3.5 L'immunomicroscopie électronique

La microscopie immunoélectronique permet de localiser de façon très précise les structures de la membrane basale sur lesquels se fixent les autoanticorps. Cependant, cette technique est réalisée uniquement dans les laboratoires hospitaliers de référence. De plus, elle ne permet pas d'identifier les cibles moléculaires des auto-anticorps.

1.2 La pemphigoïde des muqueuses

1.2.1 Définition

La **pemphigoïde** (du grec *pemphis* = bulle, ampoule) **des muqueuses** (PM) fait partie des **dermatoses bulleuses sous-épidermiques**. C'est une pathologie **inflammatoire** qui est caractérisée par un **dépôt linéaire d'IgG, d'IgA et/ou de C3** le long de la **membrane basale** épithéliale ainsi que par une **atteinte prédominante des muqueuses**.

Anciennement dénommée pemphigoïde cicatricielle, celle-ci désigne désormais la forme clinique rare qui touche majoritairement la peau, et dans laquelle les lésions cutanées évoluent sous-forme de cicatrices. [16,17]

C'est une maladie **rare** (incidence estimée à 70 nouveaux cas/an), qui survient préférentiellement chez le sujet âgé (entre **60 et 80 ans**) avec une certaine **prédominance féminine**. [18]

Bien que l'étiologie soit **inconnue**, des auto-anticorps circulants dirigés contre la **JCE** seraient à l'origine de cette réaction inflammatoire. Ces auto-anticorps reconnaissent une cible antigénique majeure : **BP180**. Cependant, ce n'est pas la seule ; en effet un certain nombre d'autres antigènes cibles ont été identifiés, notamment la laminine 332 (ou laminine 5), la BP230, et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. [5,12,19]

Certaines études montrent un lien avec la prise de certains médicaments tels que le furosémide, certains antibiotiques à base de pénicilline, etc. [20-22]

Il existe une prédisposition génétique liée à l'allèle HLA-DQB1*0301 DQw7 sur le chromosome 6. Cet allèle aurait un rôle dans la reconnaissance des auto-antigènes cibles au niveau de la JCE par l'immunité cellulaire. [18,23]

1.2.2 Description clinique

La PM est une **maladie chronique évoluant par poussées**, qui peut survenir initialement au niveau d'une ou de plusieurs muqueuses. [10]

1.2.2.1 Caractéristiques cliniques des pemphigoïdes des muqueuses

Les patients atteints de PM présentent généralement des bulles tendues évoluant vers des érosions/ulcérations au niveau des muqueuses et, dans une moindre mesure, de la peau. Ces lésions guérissent habituellement sous forme de cicatrices, de façon plus rare au niveau de la cavité buccale.[10]

1.2.2.1.1 Atteintes de la cavité buccale

L'atteinte de la cavité buccale est la plus fréquente (dans **85% des cas**) et volontiers inaugurale [10].

Les sites intra-buccaux comprennent la gencive attachée (80% des cas), la muqueuse buccale (58%), le palais (26%), la muqueuse alvéolaire (16%), la langue (15%) et la lèvre inférieure (7%). [18]

Des **bulles** de contenu clair ou hématiche, d'aspect **tendu**, à **contours érythémateux**, peuvent être retrouvées au niveau de toutes ces muqueuses (Figure 4-5).



Figure 4 : Ulcérations à contours érythémateux au niveau du palais dur, chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain)



Figure 5 : Bulle muqueuse chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain)

Elles finissent généralement par se rompre, de façon spontanée ou bien de façon traumatique, pour laisser place à des **érosions/ulcérations** (Figure 6-7).



***Figure 6 :** Bulles muqueuses, à contours érythémateux, chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain)*



***Figure 7 :** Erosions / ulcérations chez un patient atteint de pemphigoïde des muqueuses (JC Fricain)*

Au niveau gingival, on retrouve classiquement une gingivite **érosive** (desquamative) qui peut aller d'un simple érythème gingival localisé, à une gingivite généralisée où prédominent des bulles et/ou des ulcérations (Figure 7-8).

La gingivite érosive peut également être retrouvée dans le pemphigus vulgaire et dans le lichen plan oral qui doivent être exclus. [18] Ces lésions gingivales finissent par cicatriser en s'atrophiant, laissant parfois un aspect vernis de la gencive. [17]



Figure 8 : Gingivite érosive avec atteinte diffuse de la gencive au maxillaire (JC Fricain)

Le **signe de la pince** est caractéristique de la PM. Il est positif lorsque la traction de la gencive proche d'une lésion entraîne un décollement important (de plusieurs mm) de la partie superficielle de la muqueuse (Figure 9). Cela témoigne de la fragilité de la zone de jonction épithélio-conjonctive. [17] La partie décollée représente le toit de la bulle, c'est à dire l'épithélium qui n'adhère plus à la lame basale.



Figure 9 : Décollement par traction de l'épithélium gingival lors du test de la pince (JC Fricain)

Ces atteintes sont souvent très douloureuses, ce qui peut gêner l'alimentation du patient à l'origine d'une **dysphagie**. L'évaluation de la douleur doit donc être réalisée, car elle peut notamment

entraver les efforts d'hygiène bucco-dentaire, à l'origine d'une accumulation de plaque dentaire, et peut donc augmenter le risque de développer une maladie parodontale (Figure 10).

Par ailleurs, le traitement parodontal en tant que tel ne permet pas d'obtenir une résolution de l'inflammation gingivale.



Figure 10 : Défaut d'hygiène entraînant une accumulation de plaque bactérienne dans la gingivite érosive (JC Fricain)

1.2.2.1.2 Atteinte oculaire

L'atteinte oculaire est la seconde atteinte la plus fréquente (50 à 60 % des cas). Elle se traduit par une **conjonctivite chronique érythémateuse** avec une **évolution cicatricielle** qui peut conduire à une **cécité** en cas de diagnostic tardif et/ou d'absence de traitement. [17]

Elle participe à déterminer la sévérité de la pathologie. Il est donc indispensable de réaliser un **examen ophtalmologique** lors du diagnostic.

1.2.2.1.3 Atteinte nasale, pharyngée, laryngée et oesophagienne

Les atteintes des muqueuses nasales, pharyngo-laryngée (8-20 % des cas) et œsophagienne (4 % des cas) peuvent entraîner une dysphonie, une dyspnée, et/ou une dysphagie avec perte de poids et, dans les cas sévères, mettent en jeu le pronostic vital du patient. [17]

1.2.2.1.4 Atteinte génitale, anale

Une atteinte génitale est présente dans 15% des cas [17], réalisant :

- chez l'homme un tableau de balanite érosive et synéchiante avec adhérence du gland au prépuce et rarement un phimosis ou une sténose urétrale
- chez la femme un tableau de lésions érosives post-bulleuses responsables d'inconfort, de douleurs et/ou de dysurie.

1.2.2.1.5 Atteinte cutanée

On peut aussi retrouver une atteinte cutanée, moins fréquente (dans 25% des cas). [17] Les lésions bulleuses sont peu nombreuses, à type d'érosions chroniques associées à des cicatrices atrophiques (Figure 11), notamment au niveau du cuir chevelu ce qui peut entraîner une alopécie.



Figure 11 : Atteinte cutanée de la pemphigoïde des muqueuses : érosion du cuir chevelu et cicatrice chronique (JC Fricain)

1.2.2.2 Les différentes formes cliniques de pemphigoïde des muqueuses

Les formes cliniques de PM sont variées. La forme la plus fréquente correspond à une atteinte de plusieurs muqueuses, plus ou moins associée à des lésions cutanées.

Une seule muqueuse peut également être la cible du processus auto-immun. Ce sont le plus souvent des **PM avec atteinte buccale stricte** ou des PM avec atteinte oculaire stricte. Celles-ci évoluent habituellement sur un mode chronique mono-symptomatique pendant parfois plusieurs années. [17]

1.2.3 Diagnostic positif de pemphigoïde des muqueuses

Un diagnostic précoce de PM est essentiel car un traitement efficace doit être mis en place le plus tôt possible, afin d'éviter des complications graves.

La conférence de consensus de Chicago (2002) [16] a souligné le caractère primordial des **critères cliniques et de l'IFD (gold standard) dans le diagnostic des PM**. Cependant, le diagnostic différentiel avec d'autres DBAI avec atteinte buccale peut se révéler complexe. Certains examens spécialisés, disponibles seulement dans certains laboratoires, peuvent être utilisés en routine pour confirmer le diagnostic de PM.

1.2.3.1 Examen histologique

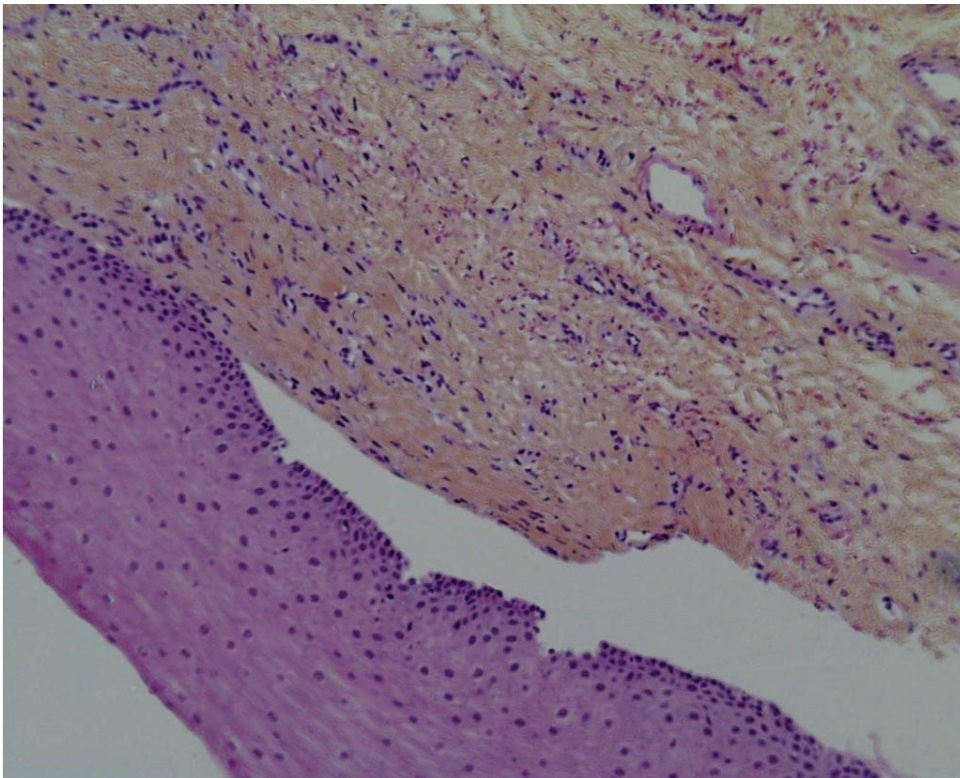


Figure 12 : Examen histologique d'une biopsie de muqueuse buccale révélant la présence d'une séparation bulleuse sous épithéliale. (JC Fricain)

L'analyse histologique, au microscope optique, d'un prélèvement de muqueuse péri-lésionnelle, révèle :

- La présence **d'une bulle sous-épithéliale, avec un épithélium intact** (absence d'acantholyse et de nécrose de l'épithélium).
- La présence, inconstante, d'un chorion inflammatoire infiltré par des lymphocytes, des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, en regard de la bulle.

Des remaniements fibro-cicatriciels peuvent être observés dans les lésions plus avancées. [17]

Les prélèvements doivent parfois être répétés, et le risque d'exacerbation de la maladie inflammatoire ou de fibrose excessive doit être pris en compte.

1.2.3.2 Examen par immunofluorescence directe

L'IFD sur un prélèvement péri-lésionnel montre, en microscopie optique, **un dépôt linéaire d'IgG, de C3, et/ou d'IgA, au niveau de la membrane basale.**

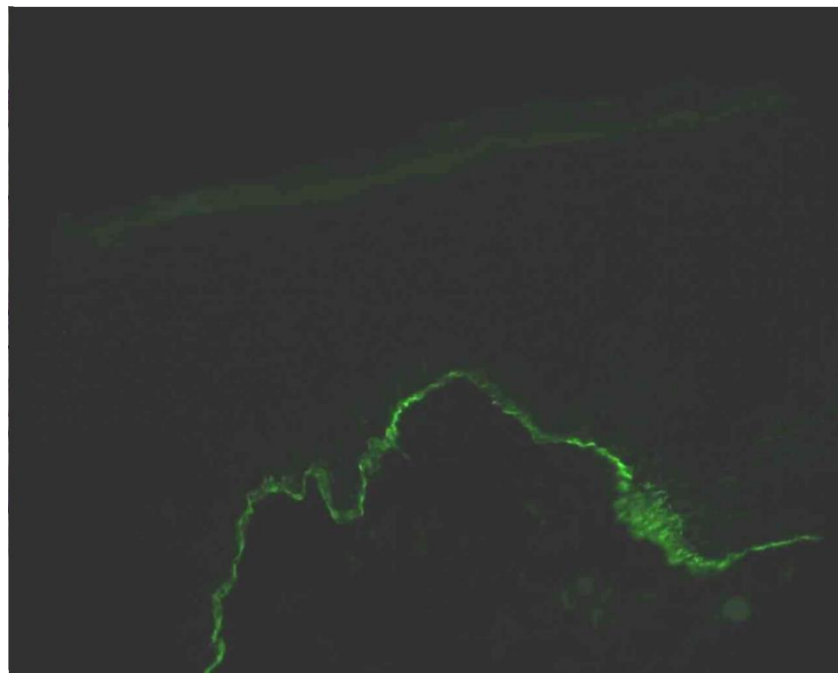


Figure 13 : Anticorps anti-membrane basale mis en évidence par immunofluorescence directe

Elle ne permet pas de différencier avec certitude la PM de la PB.[16]

Cet examen étant invasif, le prélèvement ne peut être renouvelé facilement. En effet, la répétition des biopsies gingivales pourrait entraîner des problèmes esthétiques et/ou fonctionnels. Il se peut également que les patients soient incapables de se présenter à des séances rapprochées, qu'ils prennent un traitement anti-coagulant rendant difficile la biopsie, ou bien ils peuvent aussi refuser la pratique de gestes chirurgicaux.

1.2.3.3 Examen par immunofluorescence indirecte

Ce sont majoritairement des anticorps anti-membrane basale de type IgG qui peuvent être détectés au niveau du versant épithélial de la bulle, mais également au niveau du versant conjonctif. Des IgA peuvent aussi être reconnus dans 20% des cas. [1] Cependant, l'IFI n'est pas un critère diagnostic suffisant selon la conférence de consensus de Chicago (2002).[16]

1.2.3.4 Les tests ELISA

Des tests ELISA sont prescrits en routine dans le diagnostic de PM afin de rechercher des anticorps de type IgG anti-BP180 (spécifiques du domaine protéique NC16A) et anti-BP230, à partir d'un prélèvement sanguin. Leurs performances diagnostiques restent peu évaluées à ce jour, notamment en France. Par ailleurs, il n'existe pas de tests ELISA commercialisés pour rechercher des anticorps anti-laminine 332 (ou lamine 5) anti-intégrine $\alpha 6\beta 4$. [17]

1.2.3.5 L'immunomicroscopie électronique

Elle révèle, de façon très sensible, des destructions focales au niveau de la lamina densa de la membrane basale, en lien avec un dépôt important d'anticorps anti-BP180 [17]. Cependant, cet



Figure 14 : Etude par microscopie électronique d'une lésion cutanée montrant une destruction focale de la lamina densa au niveau de la membrane basale [17]

examen n'est pas réalisé en routine, car peu de centres sont équipés.

1.2.4 Diagnostics différentiels des pemphigoïdes des muqueuses

La pemphigoïde des muqueuses doit être différenciée des autres dermatoses avec atteinte de la muqueuse buccale. Les éléments permettant de réaliser le diagnostic différentiel sont résumés dans le tableau 2.

Disease	Target antigen ¹	Clinical characteristics	Diagnostic tests ²
<i>Pemphigus diseases</i>			
Pemphigus vulgaris	Dsg 3 Dsg 1	Erosions of mucous membranes, flaccid blisters/erosions of the skin	DIF: ICF IgG/C3 IIF monkey esophagus: ICF IgG ELISA, IIF: Dsg3+ Dsg1±
Pemphigus foliaceus	Dsg 1	Flaccid blisters/erosions of the skin, scaling erosions and plaques	DIF: ICF IgG/C3 IIF monkey esophagus: ICF IgG ELISA, IIF: Dsg1+
IgA pemphigus	Dsc 1, 2, 3 Dsg 1, 3	Pustules mainly in intertriginous areas	DIF: ICF IgA/C3 IIF monkey esophagus: ICF IgA ELISA, IIF: Dsc1, 2, 3 Dsg 1, 3 IgA+
Paraneoplastic pemphigus	Dsg 3, envoplakin, periplakin, desmoplakin I/II, α2macroglobulin-like1, plectin, epiplakin, Dsc 1, 2, 3	Predominant erosions of oral mucosa and lips, neoplasia (hematological malignancies, thymoma, Castleman's disease)	DIF: ICF IgG/C3 ± BMF IIF monkey esophagus: ICF IgG ± BMF Rat/monkey bladder: urothelium + ELISA, IIF: Dsg3+, envoplakin +
<i>Pemphigoid diseases</i>			
Bullous pemphigoid	BP180 NC16A, BP230	Tense blisters, erosions, erythema, urticarial plaques, severe itch	DIF: BMF, n-pattern IIF monkey esophagus: BMF IIF SSS: blister roof ELISA, IIF: BP180+, BP230+
Mucous membrane pemphigoid	BP180, (LAD-1), laminin 332, BP230, α4β6-Integrin	Predominant mucous membrane lesions (oral > conjunctival > nasal)	DIF: BMF, n-pattern IIF monkey esophagus: BMF IIF SSS: blister roof and/or blister floor ELISA: BP180+, BP230+ IB: LAD-1+; IB: BP180+; IB, IIF: laminin332+; IB: integrins+
Pemphigoid gestationis	BP180 NC16A, BP230	Vesicles, urticarial plaques, erythema mainly in the periumbilical area; severe itch	DIF: BMF, n-pattern IIF monkey esophagus: BMF IIF complement-activated SSS: blister roof ELISA, IIF BP180+, BP230+
Anti-p200/laminin γ1 pemphigoid	p200 protein, laminin γ1	As in bullous pemphigoid	DIF: BMF, n-pattern IIF monkey esophagus: BMF IIF SSS: blister floor IB: p200+, laminin γ1 +
Linear IgA disease	BP180 (LAD-1), type VII collagen	Vesicles at the lesion margins (string of pearls sign) sometimes; otherwise like bullous pemphigoid	DIF: BMF, n-pattern (IgA) IIF monkey esophagus: BMF (IgA) IIF SSS: blister roof (IgA) IB, ELISA: BP180+(IgA), LAD-1(IgA)+
Epidermolysis bullosa acquisita	Type VII collagen	Tense blisters and erosions of skin and mucous membranes	DIF: u-pattern IIF monkey esophagus: BMF IIF SSS: blister floor ELISA, IIF: COL7+

Tableau 2 : Eléments du diagnostic différentiel des pemphigoïde des muqueuses [17]

Légende : BMF : Membrane basale fluorescente ; BP180 : Bullous pemphigoid 180 kDa ; BP230 : Bullous pemphigoid 230 kDa ; Col7+ : Collagène de type 7 ; DIF : Immunofluorescence directe ; DSG : Desmogléine ; DSC : Desmocolline ; ELISA : Enzyme-linked immunorbant assay ; ICF : Fluorescence intercellulaire ; Ig(A/G) : Immunoglobuline de type A ou G ; IIF : Immunofluorescence indirecte ; IB : Immunoblot ; LAD-1 : Soluble ectodomain of BP180 ; SSS : Salt-split skin

1.2.5 Prise en charge des pemphigoïdes des muqueuses.

La thérapeutique est multidisciplinaire et adaptée à l'âge du patient, ses antécédents et son état de santé générale.

1.2.5.1 Objectifs

Les objectifs de la thérapeutique sont multiples :

- Maitriser la douleur et rétablir un bon état général
- Traiter les lésions actives
- Prévenir les récurrences et les complications
- Apprendre au patient à vivre avec sa maladie chronique (éducation thérapeutique)

1.2.5.2 Prise en charge en odontologie

Lorsque le chirurgien-dentiste suspecte cliniquement une PM, celui-ci doit systématiquement **l'adresser à un médecin spécialiste dans un centre de référence** afin de faire le diagnostic et la prise en charge thérapeutique. Il est nécessaire de ne pas prescrire des traitements par corticoïdes (locaux ou *per os*) avant de poser le diagnostic, sous peine de fausser les résultats des examens immunologiques complémentaires.

Il doit établir en première intention un bilan dentaire et parodontal qui doit être remis au patient à destination du dermatologue référent.

Une fois que la prise en charge médicale (voir dessous) de la PM est effective, le chirurgien-dentiste doit proposer un certain nombre de mesures au patient afin de réduire les douleurs gingivales et accélérer de façon significative la cicatrisation gingivale.

Ces mesures sont :

- une **éducation thérapeutique** concernant l'**hygiène bucco-dentaire** :
 - incitation au **sevrage tabagique**
 - brossage bi-quotidien avec un dentifrice fluoré
 - éviter l'utilisation de brosses à dents électriques, privilégier plutôt un brossage manuel avec une brosse à dent à poils souples, et suivant la technique du rouleau
 - réaliser des bains de bouche antiseptiques avec des produits sans alcool (ex : chlorhexidine à 12%)
- un **suivi dentaire et parodontal régulier et fréquent**
- la réalisation des soins dentaires avec **certaines précautions** :
 - anesthésies locales réalisées **lentement** pour éviter la formation de bulles
 - détartrages et surfaçages, si nécessaires, minutieux, en évitant le polissage dentaire
 - report des actes entraînant un frottement des muqueuses buccales tant que la PM n'est pas stabilisée (ex : prise d'empreinte)

1.2.5.3 Prise en charge médicale

Le dermatologue hospitalier référent va réaliser les examens complémentaires, le diagnostic, le bilan d'extension, et va coordonner une prise en charge thérapeutique globale.

Le traitement est médical.

Dans les formes de PM limitées à la cavité buccale, le traitement fait intervenir classiquement en première intention :

- des **dermocorticoïdes contenant du propionate de clobétasol** (ex : Dermoval® crème/gel)
- des bains de bouches à base de comprimés effervescents de prednisolone (ex : Solupred®)
- un traitement antalgique adapté à l'EVA : spray ou gel de lidocaïne

La **dapsone** (Disulone®) est le traitement systémique utilisé en première intention. Il est particulièrement indiqué dans les formes peu évolutives ou débutantes. Avant de prescrire la dapsone, il est nécessaire d'éliminer un éventuel déficit en **glucose-6-phosphate déshydrogénase** (G6PD). Par la suite, une **surveillance** régulière de **l'hémogramme**, associé à un dosage régulier de la **méthémoglobinémie** est recommandée.

La corticothérapie générale est indiquée dans les formes à début très inflammatoire ou résistantes aux traitements, en association à la dapsone ou à certains immunosuppresseurs.

Un **bilan ophtalmologique** doit être réalisé, même en l'absence de signes oculaires, afin de rechercher une éventuelle atteinte conjonctivale.

Un soutien psychologique, ainsi qu'un régime alimentaire particulier, peuvent également être proposés au cas par cas.

Matériel et Méthode

2.1 Rappel des objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 dans le diagnostic des pemphigoïdes des muqueuses avec atteinte endobuccale stricte en évaluant leur sensibilité, leur spécificité, leur valeur prédictive positive et leur valeur prédictive négative.

2.2 Type d'étude

Une **étude diagnostique rétrospective monocentrique**, basée sur les résultats des tests ELISA réalisés dans le cadre du diagnostic de DBAI, a été conduite dans l'Unité d'Activité Médicale des pathologies muqueuses du CHU de Bordeaux

2.3 Population de l'étude

La population source était constituée par des patients qui avaient reçu un diagnostic de DBAI entre janvier 2010 et septembre 2021 par le Professeur Jean-Christophe Fricain.

Les critères d'inclusion de l'étude étaient :

- avoir subi une biopsie avec analyse en **IFD** lors de la démarche diagnostique.
- avoir réalisé **un test ELISA** pour la recherche d'anticorps **anti-BP180** et **anti-BP230**, au cours de la période de diagnostic.
- Les patient qui présentaient des atteintes extra-buccales de PM (région ophtalmique, laryngée, pharyngée, nasale, anale, cutanée) étaient exclus de l'étude.

Les **critères diagnostics de PM** avec atteinte buccale stricte, dans notre étude, étaient :

- **signes évocateurs** de pemphigoïde des muqueuses : présence de bulle et/ou d'ulcérations gingivales au niveau de la gencive attachée et/ou de la muqueuse buccale, signe de la pince positif.
- la présence **de dépôts linéaires d'IgG et/ou C3/IgA au niveau de la membrane basale à l'IFD.**

Le groupe contrôle était constitué par des patients qui avaient une DBAI différente de la PM.

2.4 Les tests ELISA

Un prélèvement sanguin avait été fait pour chaque patient par une infirmière dans le CHU de Bordeaux.

Les tests ELISA ont été réalisés avec des kits de la marque Euroimmun® (voir annexe 1) dans le laboratoire d'Immunologie et Biothérapies du pôle biologie du CHU de Rouen. Les références des tests étaient : ELISA anti-BP180-4X REF EA 1502-4801-2 G et ELISA anti-BP230-CF REF EA1502-4801-1 G. Ces tests ne reconnaissaient que des anticorps de classe IgG. Selon les recommandations du fabricant, les tests avaient tous les deux la même valeur seuil de 20 uA/ml pour les anticorps anti-BP180-NC16A et anti-BP230. Au-dessus de cette valeur seuil, les patients étaient considérés comme positifs, en dessous ils étaient considérés comme négatifs aux tests.

2.5 Source et archivage des données

Les photographies des lésions buccales réalisées au cours des consultations diagnostiques nous ont permis de retrouver les dossiers médicaux informatiques des patients. Les données recueillies étaient : l'âge, le sexe et les résultats des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 qui avaient été réalisés.

Ces données ont été anonymisées et stockées sur un ordinateur du CHU de Bordeaux.

2.6 Analyse statistique

Afin d'analyser les performances diagnostiques des test ELISA anti-BP180 et anti-BP230 dans e diagnostic de PM avec atteinte buccale stricte, nous avons calculé leur sensibilité (Se), leur spécificité (Sp), leur valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN).

Résultats

3.1 Population étudiée

68 patients ont été inclus pour cette étude. Parmi eux, 10 patients ont été exclus car ils présentaient des atteintes extra-buccales de PM (cf. figure 15). La population de l'étude était constituée de 58 patients : 35 patients qui avaient une atteinte buccale stricte de PM, dont 25 femmes et 10 hommes (**F/H = 2,5**), d'âge moyen **70 ans** ($ET \pm 11,2$), et 23 patients qui étaient atteints d'une autre DBAI que la PM (groupe contrôle) dont 15 pemphigus vulgaires, 6 pemphigoïde bulleuse, 1 lichen plan pemphigoïde et 1 dermatose à IgA linéaire.

Diagnostic	Nombre de patients	Ratio F:H	Age (moyenne \pm ET)
PM	35	25:10	70 \pm 11,2
ADBAI	23	12:11	63 \pm 11,5

Tableau 3 : Données démographiques de la population de l'étude

3.2 Analyse des performances diagnostiques

Sur la période d'évaluation, les tests ELISA anti-BP180 se sont révélés positifs pour 9 patients atteints de PM avec atteinte endobuccale stricte (n=35), soit environ **26% (VP)**, et 26 patients avaient un résultat négatif alors qu'ils avaient la maladie soit **74% (FN)**. Chez les patients qui avaient une ADBAI (n=23), donc non-malades, 16 d'entre eux étaient négatifs aux tests ELISA anti-BP180, soit **70% (VN)**. Sur les 7 patients positifs, soit **30% (FP)**, 6 d'entre eux étaient atteints de pemphigoïde bulleuse, et 1 seul patient avait un lichen plan pemphigoïde.

Par ailleurs, aucun patient atteint de PM avec atteinte endobuccale stricte ne s'est révélé positif au test ELISA anti-BP230, et 35 patients étaient négatifs alors qu'ils étaient malades, soit **100% (FN)**. Chez les patients ADBAI, 22 patients se sont révélés négatifs au test ELISA anti-BP230, soit **96% (VN)**. Le seul résultat positif au test ELISA anti-BP230 concerne un patient atteint de pemphigoïde bulleuse, soit 4% (**FP**).

L'analyse des performances diagnostique des tests ELISA est résumée dans le tableau 4.

	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
Tests ELISA anti-BP180	26 %	70 %	56 %	38 %
Tests ELISA anti-BP230	0 %	96 %	0 %	39 %

Tableau 4 : Performances diagnostiques des tests ELISA dans la PM

Légende : VPN : Valeur prédictive négative, VPP : Valeur prédictive positive

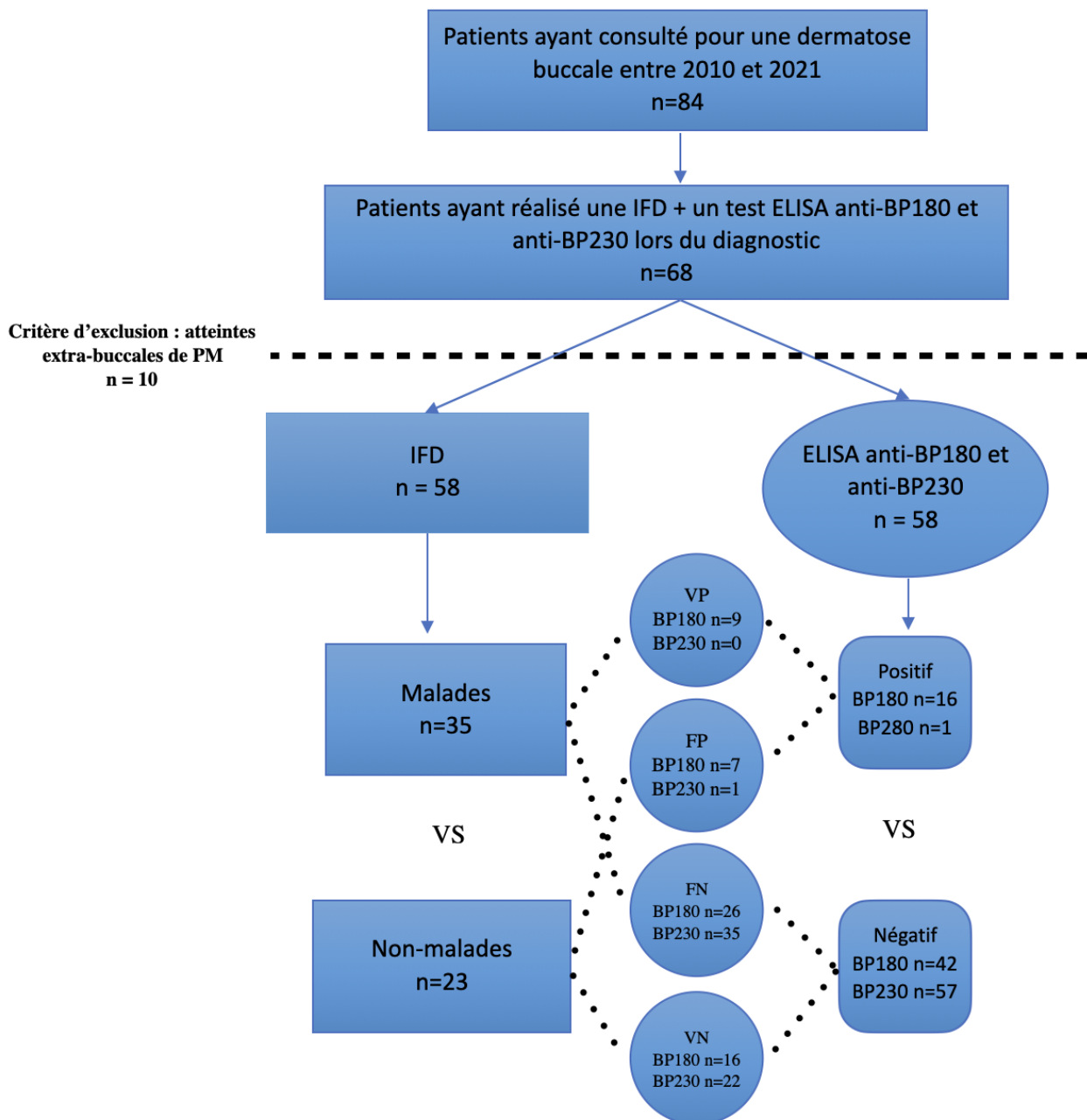


Figure 15 : Diagramme résumé de l'étude

Légende : DBAI : Dermatose bulleuse auto-immune, ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, IFD : Immunofluorescence directe, FN : Faux négatifs, FP : Faux positifs, PM : Pemphigoïde des muqueuses, VN : Vrais négatifs, VP : Vrais positifs

Discussion

4.1 Discussion des résultats

4.1.1 La population étudiée

4.1.1.1 Sex ratio

Notre étude montre une prédominance de femmes atteintes de pemphigoïde des muqueuses avec une forme buccale stricte (F/H = 2,5), ce qui est concordant avec les autres études présentes sur le sujet dans la littérature. Ainsi dans l'étude rétrospective de Petruzzi et al. [24], environ 4,5 femmes sont atteintes pour 1 homme, tandis que dans l'étude de Vella et al. [25] le sex ratio F/H est de 3,16.

4.1.1.2 Âge au moment du diagnostic

L'âge moyen du diagnostic de PM dans notre étude est de 70,3 ans, ce qui est supérieur celui retrouvé dans d'autres études. *Vella et al.* décrit un âge moyen au moment du diagnostic de 63,5 ans. La différence est plus importante avec *Petruzzi et al.*, qui décrit un âge moyen de 58,3 ans. Cependant, l'âge moyen dans notre étude correspond à la fourchette d'âge décrite par l'HAS [1].

4.1.2 Efficacité des tests ELISA

Dans notre étude, seuls 28% des patients qui ont une pemphigoïde des muqueuses avec atteinte endobuccale stricte ont été positifs aux tests ELISA anti-BP180 lors du diagnostic. Par ailleurs, on peut noter qu'aucun d'entre eux ne se sont révélés positifs aux tests ELISA anti-BP230.

Les valeurs retrouvées dans notre étude sont comparables à celles décrites dans l'étude multicentrique de *Cozzani et al.* (2016) [26]. Celle-ci incluait 39 patients atteints de forme orale pure de PM, et montrait une sensibilité des tests ELISA anti-BP180 d'environ 22% pour les tests anti-BP180 et d'environ 6% pour les tests anti-BP230. Cependant, la définition précise de la forme orale pure de PM n'est pas donnée précisément.

Petruzzi et al. (2020) ont réalisé une étude prospective portant sur 30 patients atteints de PM buccale stricte et 42 autres dermatoses buccales (15 pemphigus oraux, 23 lichen plan oraux, 2 érythèmes polymorphse et 2 lupus oraux), qui décrit une sensibilité, pour le test ELISA anti-BP180 uniquement, de 50%, une spécificité de 83%, une VPP de 68 % et une VPN de 70%. Cependant, cette étude utilisait des kits ELISA anti-BP180 de la marque MBL® (Naka-ku, Nagoya, Japan) avec un seuil de positivité plus de deux fois inférieur (9 UA/ml) aux tests de la marque Euroimmun® utilisés dans notre étude. De plus, la durée de l'étude ne nous est pas donnée. L'étude d'*Hayakawa et al* (2014) [12], sur 30 patients PM buccale stricte, décrit une sensibilité des tests anti-BP180 et anti-BP230 de 23% et 0% respectivement. Cependant les tests ont été réalisés dans cette étude avec les kits MBL®, et aucun seuil de positivité n'a été donné.

Les faibles résultats obtenus concernant la sensibilité, la spécificité, la VPP et la VPN des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230, ne permettent pas de recommander ces tests comme une alternative au diagnostic de PM par les méthodes conventionnelles. Peu d'études sont présentes sur ce sujet dans la littérature.

Il est intéressant de noter que nos résultats sont plus faibles que ceux décrit par *Bernard et al.* [27] en 1995, avec des anticorps circulants anti-BP180 et anti-BP230 retrouvés chez 82% des patients atteints d'une PM avec des atteintes extra-buccales. Dans notre étude, les tests ELISA étaient positifs chez 4 patients parmi les 10 patients qui présentaient des formes extra-buccales, soit 40%. Plus récemment, la revue systématique d'articles faite en 2015 par *Amber, Bloom et Hertl* [28] a décrit une sensibilité des tests ELISA pour BP180, ainsi que pour BP230, nettement supérieure lorsqu'il y a des atteintes extra-buccales. Cela montrerait que les titres des auto-anticorps anti-BP180 et anti-BP230 sont probablement plus élevés dans les PM avec atteintes extra-buccales que dans les PM avec atteinte exclusive de la cavité buccale.

4.2 Principales forces de l'étude

Cette étude est, à notre connaissance, la seule étude française sur le sujet. En effet, quelques études se sont intéressées aux étiologies, aux cibles antigéniques spécifiques ou à la prise en charge de la PM, mais aucune ne traite de la valeur diagnostique des tests ELISA pratiqués lors du diagnostic.

Bien qu'il s'agisse d'une maladie rare (pour rappel : 70 nouveaux cas par an estimés en France), cette étude comprend un nombre de patients atteint de PM avec atteinte endobuccale stricte (rappel : 35 cas de PM dans notre étude) relativement supérieur aux autres études : 30 cas dans l'étude italienne de *Petruzzi et al.* et 30 cas dans l'étude d'*Hayakawa et al* (2014) [12].

Concernant la population recrutée, les critères d'inclusion et d'exclusion, ainsi que le diagnostic réalisé par un seul praticien expérimenté, limitaient les biais de classement.

4.3 Limites de l'étude

C'est une étude rétrospective et l'approche diagnostique n'était pas adaptée spécifiquement à l'étude que nous avons conduite. Ainsi, un certain nombre de données concernant les résultats des tests ELISA étaient manquantes. Cependant, une étude prospective paraissait difficilement réalisable en raison de l'incidence très faible de la PM. Cela aurait nécessité une période de suivi sur plusieurs années.

Enfin, la PM est une pathologie d'évolution chronique, et nous n'avons pas assez de recul clinique sur les patients récemment diagnostiqués. Ainsi des atteintes extra-buccales de PM pourraient se manifester plusieurs années après le début de la maladie. [17,29]

Conclusion

Les résultats de notre étude, ainsi que les recherches menées au cours de l'élaboration de cette thèse, nous ont permis de répondre à notre problématique : les faibles performances diagnostiques des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 retrouvées dans notre étude, ne nous permettent pas de recommander l'usage systématique de ces examens dans le diagnostic de pemphigoïde des muqueuses avec atteinte endobuccale stricte.

L'examen clinique associé à l'immunofluorescence directe restent la règle dans le diagnostic.

Cependant, la recherche de nouvelles cibles antigéniques ayant un rôle dans la réaction auto-immune à l'origine de la PM, pourraient à l'avenir permettre de constituer un outil supplémentaire dans le diagnostic de PM.

Bibliographie

- [1] HAS (Haute Autorité de Santé). Protocole national de diagnostic et de soins - Maladies bulleuses auto-immunes. [Internet]. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-10/synthese_medecin_traitant_sur_les_maladies_bulleuses_auto-immunes_2011-10-24_15-35-11_752.pdf
- [2] Witte M, Zillikens D, Schmidt E. Diagnosis of Autoimmune Blistering Diseases. *Front Med.* (2018) 5:296.
- [3] Van Beek N, Zillikens D, Schmidt E. Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Dtsch Dermatol Ges.* (2018) 16:1077–91.
- [4] Saschenbrecker, S., Karl, I., Komorowski, L., Probst, C., Dähnrich, C., Fechner, K., ... Schlumberger, W. (2019). Serological Diagnosis of Autoimmune Bullous Skin Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10.
- [5] Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2002;30:224-232.
- [6] Yoshida M, Hamada T, Amagai M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2006;41:21-30.
- [7] Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 224–32.
- [8] Tampoia M, Giavarina D, Di Giorgio C et al. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to detect anti-skin autoantibodies in autoimmune blistering skin diseases : a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2012; 12: 121–6.
- [9] Mouquet H, Gilbert D, Musette P et al. Avancées moléculaires dans la physiopathologie des maladies bulleuses autoimmunes. *Ann Dermatol Venereol* 2005;132:231-42
- [10] Schmidt, E., & Zillikens, D. (2013). Pemphigoid diseases. *The Lancet*, 381(9863), 320–332.
- [11] Borradori, L., & Sonnenberg, A. (1999). Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(4), 411–418.
- [12] Hayakawa, T., Furumura, M., Fukano, H., Li, X., Ishii, N., Hamada, T., Hashimoto, T. (2014). Diagnosis of oral mucous membrane pemphigoid by means of combined serologic testing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117(4), 483–496.
- [13] Humbel RL. (2003) Autoanticorps et autoantigènes de la peau. *GEAI l'info* n°6 octobre 2003 page 2
- [14] Van Beek, N., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2018). Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 16(9), 1077–1091.

- [15] Ingen-Housz-Oro, S., Hüe, S., Grootenboer-Mignot, S., & André, C. (2013). Auto-anticorps des dermatoses bulleuses auto-immunes (pemphigus, pemphigoïde bulleuse) : ce que le dermatologue doit savoir. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 140(8-9), 563–570.
- [16] Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, et al. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid : definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol*. 2002;138(3):370–9.
- [17] Caux, F., & Prost-Squarcioni, C. (2015). Mucous Membrane Pemphigoid. *Blistering Diseases*, 363–373.
- [18] Rashid, H., Lamberts, A., Borradori, L., Alberti-Violetti, S., Barry, R. J., Caproni, M., Horváth, B. (2021). European guidelines (S3) on diagnosis and management of mucous membrane pemphigoid, initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology – Part I. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 35(9), 1750–1764.
- [19] Bédane C (2020) Mucous Membrane Pemphigoid: A Review. *J Dermatolog Clin Res* 8(2): 1132
- [20] Ingen-Housz-Oro, S., Hüe, S., Grootenboer-Mignot, S., & André, C. (2013). Auto-anticorps des dermatoses bulleuses auto-immunes (pemphigus, pemphigoïde bulleuse) : ce que le dermatologue doit savoir. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 140(8-9), 563–570.
- [21] Hayashi I, Shinkuma S, Shimizu S, et al. Mucous membrane pemphigoid with generalized blisters: IgA and IgG autoantibodies target both laminin-332 and type XVII collagen. *Br J Dermatol*. 2012;166(5): 1116–20.
- [22] P. Bernard, L. Vaillant, B. Labeille, C. Bedane, B. Arbeille, J. P. Denoeux, G. Lorette, J. M. Bonnetblanc, et C. Prost, « Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group », *Arch Dermatol*, vol. 131, no 1, p. 48-52, janv. 1995.
- [23] Setterfield J, Theron J, Vaughan RW, et al. Mucous membrane pemphigoid: HLA-DQB1*0301 is associated with all clinical sites of involvement and may be linked to antibasement membrane IgG production. *Br J Dermatol* 2001 Sep;145(3):406-14.
- [24] Petruzzi, M., Tampoia, M., Serpico, R., Lauritano, D., Lajolo, C., Lucchese, A., & Della Vella, F. (2020). *Evaluation of BP180-NC16A ELISA in exclusive oral pemphigoid diagnosis. A comparative study. Oral Diseases*.
- [26] Cozzani, E., Di Zenzo, G., Calabresi, V., Carrozzo, M., Burlando, M., Longanesi, L., Parodi, A. (2014). Autoantibody Profile of a Cohort of 78 Italian Patients with Mucous Membrane Pemphigoid: Correlation Between Reactivity Profile and Clinical Involvement. *Acta Dermato Venereologica*, 0.
- [27] P. Bernard, L. Vaillant, B. Labeille, C. Bedane, B. Arbeille, J. P. Denoeux, G. Lorette, J. M. Bonnetblanc, et C. Prost, « Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group », *Arch Dermatol*, vol. 131, no 1, p. 48-52, janv. 1995.

[28] Amber, K. T., Bloom, R., & Hertl, M. (2015). A systematic review with pooled analysis of clinical presentation and immunodiagnostic testing in mucous membrane pemphigoid: association of anti-laminin-332 IgG with oropharyngeal involvement and the usefulness of ELISA. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(1), 72–77.

[29] Syn WK, Ahmed MM. Esophageal involvement in cicatricial pemphigoid: a rare cause of dysphagia. *Dis Esophagus*. 2004;17(2):180–2.

Annexe : Protocole ELISA Euroimmun ®

Anti-BP180-NC16A-4X ELISA (IgG) Test instruction

















ORDER NO.	ANTIBODIES AGAINST	IG CLASS	SUBSTRATE	FORMAT
EA 1502-4801-2 G	BP180	IgG	Ag-coated microplate wells	48 x 01 (48)

Indication: The ELISA test kit provides a semiquantitative or quantitative in vitro assay for human autoantibodies of the immunoglobulin class IgG against BP180 in serum or plasma for the diagnosis of bullous pemphigoid (BP).

Application: The Anti-BP180-NC16A-4X ELISA (IgG) has been developed for the specific detection of circulating autoantibodies against the hemidesmosomal protein BP180, which are indicative of BP. The test is used to differentiate BP from other bullous autoimmune dermatoses. It is also suitable for monitoring patients, since the antibody titer correlates with the disease activity of BP.

Principle of the test: The test kit contains microtiter strips each with 8 individual break-off reagent wells coated with BP180. In the first reaction step, diluted patient samples are incubated in the wells. In the case of positive samples, the specific IgG antibodies (also IgA and IgM) will bind to the corresponding antigenic site. To detect the bound antibodies, a second incubation is carried out using an enzyme-labelled anti-human IgG (enzyme conjugate) catalysing a colour reaction.

Contents of the test kit:

Component	Colour	Format	Symbol
1. Microplate wells coated with antigens 6 microplate strips each containing 8 individual break-off wells in a frame, ready for use	---	6 x 8	
2. Calibrator 1 200 RU/ml (IgG, human), ready for use	dark red	1 x 2.0 ml	
3. Calibrator 2 20 RU/ml (IgG, human), ready for use	red	1 x 2.0 ml	
4. Calibrator 3 2 RU/ml (IgG, human), ready for use	light red	1 x 2.0 ml	
5. Positive control (IgG, human), ready for use	blue	1 x 2.0 ml	
6. Negative control (IgG, human), ready for use	green	1 x 2.0 ml	
7. Enzyme conjugate peroxidase-labelled anti-human IgG (rabbit), ready for use	green	1 x 12 ml	
8. Sample buffer ready for use	light blue	1 x 100 ml	
9. Wash buffer 10x concentrate	colourless	1 x 100 ml	
10. Chromogen/substrate solution TMB/H ₂ O ₂ , ready for use	colourless	1 x 12 ml	
11. Stop solution 0.5 M sulphuric acid, ready for use	colourless	1 x 12 ml	
12. Test instruction	---	1 booklet	
13. Quality control certificate	---	1 protocol	
 Lot description		 Storage temperature	
 In vitro diagnostic medical device		 Unopened usable until	



Preparation and stability of reagents

Note: All reagents must be brought to room temperature (+18°C to +25°C) approx. 30 minutes before use. After first use, the reagents are stable until the indicated expiry date if stored at +2°C to +8°C and protected from contamination, unless stated otherwise below.

- **Coated wells:** Ready for use. Tear open the resealable protective wrapping of the microplate at the recesses above the grip seam. Do not open until the microplate has reached room temperature to prevent the individual strips from moistening. Immediately replace the remaining wells of a partly used microplate in the protective wrapping and tightly seal with the integrated grip seam (Do not remove the desiccant bag).
Once the protective wrapping has been opened for the first time, the wells coated with antigens can be stored in a dry place and at a temperature between +2°C and +8°C for 4 months.
- **Calibrators and controls:** Ready for use. The reagents must be mixed thoroughly before use.
- **Enzyme conjugate:** Ready for use. The enzyme conjugate must be mixed thoroughly before use.
- **Sample buffer:** Ready for use.
- **Wash buffer:** The wash buffer is a 10x concentrate. If crystallisation occurs in the concentrated buffer, warm it to +37°C and mix well before diluting. The amount required should be removed from the bottle using a clean pipette and diluted with deionised or distilled water (1 part reagent plus 9 parts distilled water).
For example: For 1 microplate strip, 5 ml concentrate plus 45 ml water.
The working strength wash buffer is stable for 4 weeks when stored at +2°C to +8°C and handled properly.
- **Chromogen/substrate solution:** Ready for use. Close bottle immediately after use, as the contents are sensitive to light ☀. The chromogen/substrate solution must be clear on use. Do not use the solution if it is blue coloured.
- **Stop solution:** Ready for use.

Storage and stability: The test kit has to be stored at a temperature between +2°C to +8°C, do not freeze. Unopened, all test kit components are stable until the indicated expiry date.

Waste disposal: Patient samples, calibrators, controls and incubated microplate strips should be handled as infectious waste. All reagents must be disposed of in accordance with local disposal regulations.

Warning: The calibrators and controls of human origin have tested negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and anti-HIV-2. Nonetheless, all materials should be treated as being a potential infection hazard and should be handled with care. Some of the reagents contain the agent sodium azide in a non-declarable concentration. Avoid skin contact.

Preparation and stability of the serum or plasma samples

Samples: Human serum or EDTA, heparin or citrate plasma.

Stability: Patient samples to be investigated can generally be stored at +2°C to +8°C for up to 14 days. Diluted samples must be incubated within one working day.

Sample dilution: Patient samples are diluted to be investigated are diluted **1:101** with sample buffer. Example: Add 10 µl of sample to 1.0 ml sample buffer and mix well by vortexing (sample pipettes are not suitable for mixing).

Note: The calibrators and controls are prediluted and ready for use, do not dilute them.



Incubation

For **qualitative/semiquantative analysis** incubate **calibrator 2** along with the positive and negative controls and patient samples. For **quantitative analysis** incubate **calibrators 1 to 3** along with the positive and negative controls and patient samples.

Sample incubation:
(1st step) Transfer 100 µl of the calibrators, positive and negative controls or diluted patient samples into the individual microplate wells according to the pipetting protocol. Incubate for **30 minutes** at room temperature (+18°C to +25°C).

Washing:
Manual: Empty the wells and subsequently wash 3 times using 300 µl of working strength wash buffer for each wash.
Automatic: Wash the reagent wells 3 times with 450 µl of working strength wash buffer (programme setting: e.g. TECAN Columbus Washer "Overflow Mode").

Leave the wash buffer in each well for 30 to 60 seconds per washing cycle, then empty the wells. After washing (manual and automated tests), thoroughly dispose of all liquid from the microplate by tapping it on absorbent paper with the openings facing downwards to remove all residual wash buffer.

Note: Residual liquid (> 10 µl) in the reagent wells after washing can interfere with the substrate and lead to false low extinction values.

Insufficient washing (e.g. less than 3 wash cycles, too small wash buffer volumes, or too short residence times) can lead to false high extinction values.

Free positions on the microplate strip should be filled with blank wells of the same plate format as that of the parameter to be investigated.

Conjugate incubation
(2nd step) Pipette 100 µl of enzyme conjugate (peroxidase-labelled anti-human IgG) into each of the microplate wells. Incubate for **30 minutes** at room temperature (+18°C to +25°C).

Washing: Empty the wells. Wash as described above.

Substrate incubation:
(3rd step) Pipette 100 µl of chromogen/substrate solution into each of the microplate wells. Incubate for **15 minutes** at room temperature (+18°C to +25°C), protect from direct sunlight.

Stopping: Pipette 100 µl of stop solution into each of the microplate wells in the same order and at the same speed as the chromogen/substrate solution was introduced.

Measurement: **Photometric measurement** of the colour intensity should be made at a **wavelength of 450 nm** and a reference wavelength between 620 nm and 650 nm **within 30 minutes of adding the stop solution**. Prior to measuring, carefully shake the microplate to ensure a homogeneous distribution of the solution.



Pipetting protocol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 2	P 6	P 14	P 22			C 1	P 4	P 12	P 20		
B	pos.	P 7	P 15	P 23			C 2	P 5	P 13	P 21		
C	neg.	P 8	P 16	P 24			C 3	P 6	P 14	P 22		
D	P 1	P 9	P 17	P 25			pos.	P 7	P 15	P 23		
E	P 2	P 10	P 18				neg.	P 8	P 16	P 24		
F	P 3	P 11	P 19				P 1	P 9	P 17	P 25		
G	P 4	P 12	P 20				P 2	P 10	P 18			
H	P 5	P 13	P 21				P 3	P 11	P 19			

The pipetting protocol for microtiter strips 1 to 4 is an example for the **qualitative/semiquantitative analysis** of 25 patient sera (P 1 to P 25).

The pipetting protocol for microtiter strips 7 to 10 is an example for the **quantitative analysis** of 25 patient sera (P 1 to P 25).

The calibrators (C 1 to C 3), the positive (pos.) and negative (neg.) controls, and the patient samples have each been incubated in one well. The reliability of the ELISA test can be further improved by duplicate determinations for each sample. Both positive and negative controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They should be assayed with each test run.

Calculation of results

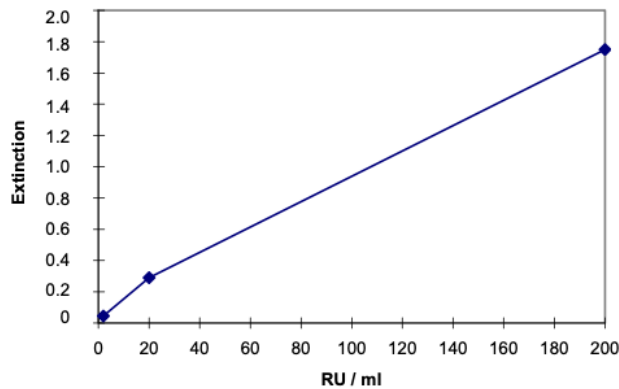
Qualitative/semiquantitative: Results can be evaluated semiquantitatively by calculating a ratio of the extinction value of the control or patient sample over the extinction value of calibrator 2. Calculate the ratio according to the following formula:

$$\frac{\text{Extinction of the control or patient sample}}{\text{Extinction of calibrator 2}} = \text{Ratio}$$

EUROIMMUN recommends interpreting results as follows:

Ratio <1.0: **negative**
Ratio ≥1.0: **positive**

Quantitative: The standard curve from which the concentration of antibodies in the serum samples can be taken is obtained by point-to-point plotting of the extinction values measured for the 3 calibration sera against the corresponding units (linear/linear). Use "point-to-point" plotting for calculation of the standard curve by computer. The following plot is an example of a typical calibration curve. Please do not use this curve for the determination of antibody concentrations in patient samples.



If the extinction for a patient sample lies above that of calibrator 1 (200 RU/ml), the result should be reported as ">200 RU/ml". It is recommended that the sample be remeasured in a new test run at a dilution of e.g. 1:400. The result in RU/ml read from the calibration curve for this sample must then be multiplied by a factor of 4.

The upper limit of the normal range (cut-off) recommended by EUROIMMUN is 20 relative units (RU)/ml. EUROIMMUN recommends interpreting results as follows:

<20 RU/ml:	negative
≥20 RU/ml:	positive

The recommendation is based on data yielded in a ROC analysis using the results of 118 samples of patients with bullous pemphigoid and 723 control samples. According to the analysis, the specificity was 98% at a cut-off of 19.8 RU/ml. The 98th percentile based on 494 healthy blood donors was 27.4 RU/ml (q.v. respective paragraphs under "Test characteristics").

For duplicate determinations the mean of the two values should be taken. If the two values deviate substantially from one another, EUROIMMUN recommends retesting the samples.

For diagnosis, the clinical picture of the patient always needs to be taken into account along with the serological findings.

Test characteristics

Calibration: As no international reference serum exists for antibodies against BP180, the calibration is performed in relative units (RU/ml).

For every group of tests performed, the relative units or ratio values determined for the positive and negative controls must lie within the limits stated for the relevant test kit lot. A quality control certificate containing these reference values is included. If the values specified for the controls are not achieved, the test results may be inaccurate and the test should be repeated.

The binding activity of the antibodies and the activity of the enzyme used are temperature-dependent. It is therefore recommended using a thermostat in all three incubation steps. The higher the room temperature (+18°C to +25°C) during the incubation steps, the greater will be the extinction values. Corresponding variations apply also to the incubation times. However, the calibrators are subject to the same influences, with the result that such variations will be largely compensated in the calculation of the result.



Antigen: BP180 is a transmembrane glycoprotein with an intracellularly localised C-terminus and an extracellular N-terminus. The ectodomain consists of 15 collagenous and 16 non-collagenous domains. The 16th non-collagenous domain (NC16A) flanking the ceratinocyte membrane describes the immunogenic epitope. The reagent wells used in the ELISA are coated with a tetramer of the NC16A domain (based on human cDNA). The recombinant protein is produced in *E.coli*.

Linearity: The linearity of the Anti-BP180-NC16A-4X ELISA (IgG) was determined by assaying at least 4 serial dilutions of different patient samples. The Anti-BP180-NC16A-4X ELISA (IgG) is linear at least in the tested concentration range of (10 RU/ml to 199 RU/ml).

Detection limit: The lower detection limit is defined as mean value of an analyte-free sample plus three times the standard deviation and is the smallest detectable antibody titer. The lower detection limit of the Anti-BP180-NC16A-4X ELISA (IgG) is 0.6 RU/ml.

Cross reactivity: The ELISA presented here specifically detects IgG class antibodies directed against BP180. Cross-reactions with other autoantibodies were not observed in samples of patients with scleroderma (n = 18).

Interference: Haemolytic, lipaemic and icteric samples showed no influence on the result up to a concentration of 10 mg/ml for haemoglobin, 20 mg/ml for triglycerides and 0.4 mg/ml for bilirubin in this ELISA.

Reproducibility: The reproducibility of the test was investigated by determining the intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) using 4 samples. The intra-assay CVs are based on 20 determinations and the inter-assay CVs on 4 determinations performed in 6 different test runs.

<i>Intra-assay variation, n = 20</i>		
Sample	Mean value (RU/ml)	CV (%)
1	27	3.0
2	61	1.2
3	119	1.6
4	177	2.1

<i>Inter-assay variation, n = 4 x 6</i>		
Sample	Mean value (RU/ml)	CV (%)
1	26	4.8
2	61	3.1
3	119	4.2
4	174	2.6

Clinical sensitivity and specificity: Sera from 118 patients with bullous pemphigoid, a control panel of 229 patients with other autoimmune diseases and 494 healthy blood donors were investigated using the EUROIMMUN Anti-BP180-NC16A-4X ELISA (IgG). The sensitivity of the ELISA for bullous pemphigoid was 88.1%, with a specificity of 97.9%.

Panel	Anti-BP180-NC16A-4X ELISA (IgG)	
	n	positive
Bullous pemphigoid	118	104 (88.1%)
Pemphigoid gestationis	20	20 (100.0%)
Asymptomatic blood donors	494	10 (2.0%)
Rheumatoid arthritis	107	2 (1.9%)
Progressive systemic sclerosis	50	2 (4.0%)
Systemic lupus erythematosus	72	1 (1.4%)
Sensitivity for bullous pemphigoid	118	104 (88.1%)
Specificity for bullous pemphigoid	723	15 (97.9%)



In a ROC analysis (AUC value: 0.965) using the results of 118 samples of patients with bullous pemphigoid and 723 control samples listed in the above table the following characteristics were determined:

Cut-off	Specificity:	Sensitivity:
13.4 RU/ml	95%	91%
19.8 RU/ml	98%	90%

Reference range: Levels of anti-BP180 antibodies were determined in 494 sera from healthy blood donors of between 18 and 68 years of age (185 women, 309 men) using the EUROIMMUN ELISA. The mean concentration of antibodies against BP180 was 4.5 RU/ml, and the values ranged from 0.01 to 168.0 RU/ml. With a cut-off of 20 RU/ml, 2.0% of blood donors were anti-BP180 positive.

Cut-off	Percentile
12.5 RU/ml	95 th
27.4 RU/ml	98 th

Clinical significance

Bullous autoimmune dermatoses belong to the organ-specific autoimmune diseases. They are characterised by the formation of autoantibodies against structural proteins of the skin. These structural proteins establish the cell-to-cell contact in keratinocytes within the epidermis and the adhesion of the epidermis to the dermis. Bullous autoimmune dermatoses are divided into 4 main groups based on their target antigens and the localisation of the blisters: pemphigoid and pemphigus diseases, epidermolysis bullosa acquisita and Dühring's dermatitis herpetiformis. In pemphigus diseases the blisters form intraepidermally, whereas in all other bullous autoimmune dermatoses they occur subepidermally.

Table. Target antigens of blister-forming autoimmune dermatoses

Disease	Target antigen
Pemphigoid disease	
Bullous pemphigoid	BP180, BP230
Pemphigoid gestationis	BP180, BP230
Linear IgA dermatosis	BP180, BP230
Mucosal pemphigoid	BP180, laminin 332, $\alpha6\beta4$ integrin, laminin 311, BP230
Lichen planus pemphigoides	BP180, BP230
Anti-laminin $\gamma1/p200$ pemphigoid	Laminin $\gamma1$ chain (p200 protein)
Epidermolysis bullosa acquisita	Collagen type VII
Dermatitis herpetiformis Dühring	Epidermal/tissue transglutaminase

Main target antigens are printed in bold.

With an incidence of 1.3 to 4.2 new cases per year per 100,000 inhabitants, bullous pemphigoid (BP) is the most frequent subepidermal blister-forming autoimmune dermatosis in central Europe and north America. The disease mainly affects elderly people. The manifestation of BP is bulging blisters at the integument. However, BP may proceed without blisters for weeks or months. Therefore, all elderly patients with irritating skin disorders persisting for long periods should be tested for BP in differential diagnosis.

Autoantibodies in BP are directed against two hemidesmosomal proteins, BP180 (type XVII collagen) and BP230.



BP180 is a transmembrane glycoprotein with an intracellularly localised C-terminus and an extracellular N-terminus. The ectodomain consists of 15 collagenous and 16 non-collagenous domains. The 16th non-collagenous domain (**NC16A**) directly flanking the ceratinocyte membrane presents the immunogenic epitope. The majority of BP patients have autoantibodies against BP180 NC16A. BP180 NC16A is, moreover, the immunodominant region in patients with pemphigoid gestationis and lichen planus pemphigoides and is found in around half of patients with mucosal pemphigoid and antibodies against BP180.

BP230 is a glycoprotein of the hemidesmosomal inner cytoplasmic plaque and contributes to the anchoring of the keratin filament system via its C-terminal domain. The N-terminal end of BP230 is important for its integration into the hemidesmosomes and interacts with BP180 and the $\beta 4$ -subunit of $\alpha 6\beta 4$ -integrin.

The **Anti-BP180-4X ELISA** uses a tetramer of the immunogenic NC16A domain and is a reliable alternative to the indirect immunofluorescence test. The advantage of the ELISA is the clear characterisation of the autoantibody specificity when using the recombinant BP180 and the resulting differentiation from other bullous autoimmune dermatoses such as pemphigus diseases, epidermolysis bullosa acquisita and Dühring's dermatitis herpetiformis. The multimer form of the autoantigen increases the immunoreactivity, thus improving the efficiency of the autoantibody test. The serum level of autoantibodies against BP180 correlates with BP activity.

The **Anti-BP230 ELISA** supplements the serological diagnosis of BP via the detection of a second, independent autoantigen in the genetic sense. In this test a recombinant BP230 is used, namely a biochemically purified C-terminal piece of the human "230 kDa bullous pemphigoid antigen" expressed in *E. coli*. Anti-BP230 develop with a time lag compared to Anti-BP180.

The diagnostic gold standard is the detection of tissue-bound autoantibodies using direct immunofluorescence. In pemphigoid disease and epidermolysis bullosa acquisita deposits of IgG/IgA/C3 are found in perilesional sample biopsies. Further differentiation is achieved in indirect immunofluorescence on human skin sheets. Final diagnosis is based on a combination of the clinical picture with the detection of autoantibodies against the individual target antigens (table) using monospecific ELISA or immunoblot analysis.

Patients who suffer from **bullous pemphigoid** exhibit antibodies against BP180 and BP230. These patients mainly have autoantibodies against BP180. The Anti-BP230-CF ELISA supplements the serological diagnosis of BP via the detection of a second, independent autoantigen in the genetic sense. Anti-BP230 develop with a time lag compared to Anti-BP180. The parallel determination of autoantibodies against BP180 and BP230 increases the serological hit rate in the diagnosis of bullous pemphigoid. The serum level of autoantibodies against BP180 correlates with the disease activity of BP, the serum level of autoantibodies against BP230 with the duration of the disease. Hence, the Anti-BP180 ELISA (IgG) and the Anti-BP230 ELISA (IgG) are not only suited to reliably serologically identifying the autoimmune dermatosis bullous pemphigoid, but also to monitoring the activity of the disease before and during treatment (e.g. with corticosteroids or in therapy-refractory cases with rituximab) and assessing the disease duration.

Literature references

1. Barnadas MA, Rubiales MV, Gonzalez MJ, Puig L, Pilar G, Baselga E, Pujol R, Alomar A, Gelpi C. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence testing in a bullous pemphigoid and pemphigoid gestationis.** International Journal of Dermatology 47(2008) 1245-1249.
2. Cunha PR, Barraviera SR. **Autoimmune bullous dermatoses.** [Article in English, Portuguese] An Bras Dermatol 84 (2009) 111-124.
3. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, Sebbag N, Pedicelli C, Sera F, Lacour JP, Wieslander J, Bruckner-Tuderman L, Borradori L, Zambruno G, Hertl M. **Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid.** Clin Immunol 128 (2008) 415-426.



4. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik.** In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
5. Kasperkiewicz M, Zillikens D. **Rituximab (anti-CD20) zur Behandlung von bullösen Autoimmundermatosen.** Hautarzt 58 (2007) 115-121.
6. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. **Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study.** Bmj 337 (2008) 160-163.
7. Probst* C, Dährnich* C, Komorowski* L, Blöcker* I, Schmidt E, Schlumberger* W, Sitaru C, Rose C, Stöcker* W, Zillikens D. [***EUROIMMUN AG**]. **Sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies by an Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the NC16A domain of BP180 as antigen.** In: Conrad K et al. (Hrsg.). From Etiopathogenesis to the Prediction of Autoimmune Diseases: Relevance of Autoantibodies. Pabst Science Publishers 5 (2007) 348-349.
8. Probst* C, Dährnich* C, Schlumberger* W, Stöcker* W, Komorowski* L, Zillikens D, Sitaru C, Rose C. [***EUROIMMUN AG**]. **Verfahren und Reagenzien zur spezifischen Detektion von Autoantikörpern bei Patienten mit blasenbildenden Autoimmundermatosen.** Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 059 574.2 (2006).
9. Probst* C, Schlumberger* W, Stöcker* W, Recke A, Schmidt E, Hashimoto T, Zhu XJ, Zillikens D, Komorowski* L. [***EUROIMMUN AG**]. **Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus.** Clin Chim Acta 410 (2009) 13-18.
10. Recke A, Rose C, Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D, Sitaru C. **Transition from pemphigus foliaceus to bullous pemphigoid: intermolecular B-cell epitope spreading without IgG subclass shifting.** J Am Acad Dermatol 61 (2009) 333-336.
11. Schmidt E, Zillikens D. **Research in practice: diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disorders.** [Article in English, German] J Dtsch Dermatol Ges 7 (2009) 296-300.
12. Sitaru C, Dährnich* C, Probst* C, Komorowski* L, Blöcker* I, Schmidt E, Schlumberger* W, Rose C, Stöcker* W, Zillikens D. [***EUROIMMUN AG**]. **Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies.** Exp Dermatol 16 (2007) 770-777.

Collège des Sciences de la Santé

UFR des Sciences Odontologiques

Serment

En présence de mes Maîtres et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de l'art dentaire.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un honoraire au-dessus de mon travail. Ma langue taira les secrets qui me seront confiés. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Mes connaissances et mon état ne serviront ni à diffuser des propos non avérés, ni à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des conditions de croyance, de nation et de race viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je promets et je jure de conformer strictement ma conduite professionnelle aux principes et aux règles prescrites par le code de déontologie.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.



Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, la Directrice de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances des tests ELISA réalisés en routine dans le diagnostic de pemphigoïde des muqueuses avec atteinte buccale stricte. Pour cela nous avons réalisé une étude diagnostique rétrospective monocentrique basée sur les résultats des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 réalisés dans le diagnostic de DBAI, entre janvier 2010 et septembre 2021, au sein de l'Unité d'Activité Médicale de pathologies des muqueuses du CHU de Bordeaux. Afin d'évaluer leurs performances diagnostiques, nous avons calculé leur sensibilité (Se), leur spécificité (Sp), leur valeur prédictive positive (VPP) et leur valeur prédictive négative (VPN). 58 patients ont été inclus dans notre étude, dont 35 avaient une pemphigoïde des muqueuses avec atteinte endobuccale stricte. Le groupe contrôle était constitué de 23 patients qui avaient une autre dermatose bulleuse auto-immune que la pemphigoïde des muqueuses. Pour BP180 : Se = 26%, Sp = 70%, VPP = 56%, VPN = 38%. Pour BP230 : Se = 0%, Sp = 96%, VPP = 0% et VPN = 39%. L'analyse des résultats semble montrer une faible performance des tests ELISA anti-BP180 et anti-BP230 dans le diagnostic de PM avec atteinte endobuccale stricte.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the performance of ELISAs tests routinely prescribed in the diagnostic of mucous membrane pemphigoid limited to buccal mucosa. For this purpose, we conducted a retrospective monocentric diagnostic study based on the results of the anti-BP180 and anti-BP230 ELISAs tests performed in the diagnosis of DBAI, between January 2010 and December 2021, in the Medical Activity Unit of Mucosal Pathologies of the Bordeaux University Hospital. In order to evaluate their performance, we calculated the sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the anti-BP180 and anti-BP230 ELISAs. 58 patients were included, 35 of whom had mucosal pemphigoid with strict buccal involvement. The control group consisted of 23 patients who had another autoimmune bullous dermatosis. For BP180 : Se = 26%, Sp = 70%, PPV = 56%, NPV = 38%. For BP230 : Se = 0%, Sp = 96%, PPV = 0% and NPV = 39%. The analysis of the results seems to show a poor performance of BP180 and BP230 ELISAs tests for the diagnosis of PM with strict endobuccal involvement.

Mots clés

Mucous membrane pemphigoid/ Bullous autoimmune disease/ ELISA/ Gingival diseases