

L'Épidermolyse Bulleuse Jonctionnelle du Braque allemand : un modèle canin spontané de l'Épidermolyse Bulleuse Jonctionnelle de l'Homme

Junctional Epidermolysis Bullosa in the german shorthaired pointer : a spontaneous model for Junctional Epidermolysis Bullosa in man

Par Eric GUAGUERE⁽¹⁾, Annabelle CAPT⁽²⁾, Flavia SPIRITO⁽²⁾ et Guerrino MENEGUZZI⁽²⁾
(communication présentée le 20 mars 2003)

RÉSUMÉ

Une Épidermolyse Bulleuse Jonctionnelle (EBJ) est décrite chez le Braque allemand et constitue un remarquable modèle canin de l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle de l'Homme. Chez le Braque allemand, cette maladie est causée par une substitution homozygote du nucléotide 1514 C-T chez les chiens EBJ. Cette variation de séquence induit un changement non conservatif de 14 acides aminés (505T-I) dans le domaine I de la laminine $\alpha 3$. Cette substitution non conservative modifie le profil d'hydrophobicité du fragment peptidique et altère donc la stabilité d'association de la chaîne $\alpha 3$ avec l'hétérotrimère $\beta 3\gamma 2$. Ceci pourrait aboutir à une dégradation du polypeptide muté. Une fraction d' $\alpha 3$ mutée pourrait s'incorporer dans la laminine 5, en altérer le fonctionnement et entraver le clivage extra-cellulaire de la chaîne $\gamma 2$. Des expériences de complémentation génétique ont donc été réalisées. Pour cela, un rétrovirus MMLV exprimant l'ADNc entier muté et sauvage de la chaîne $\alpha 3$ a été construit pour être transduit dans les kératinocytes des chiens EBJ (KEBJ). Cette transversion phénotypique a été réussie et a permis aux KEBJ de sécréter de nouveau la chaîne $\alpha 3$ et ainsi, de produire des molécules de laminine 5 fonctionnelles. Par ailleurs, ces KEBJ transduits ont montré aussi la restauration de leur capacité d'adhésion en culture. Enfin, la reconstitution d'épithéliums canins EBJ exprimant une laminine 5 hybride est désormais possible et est actuellement à l'origine d'études sur le devenir de ces greffes *ex vivo* chez des chiens EBJ.

Mots-clés : épidermolyse, bulleuse jonctionnelle, dermatose, chien, Braque allemand, thérapie génique.

Note

- (1) Clinique Vétérinaire Saint Bernard - 598 avenue de Dunkerque - 59160 Lomme - France
(2) INSERM U385 Faculté de Médecine - 28, avenue de Vallambrose - 06107 Nice - France

SUMMARY

A Junctional Epidermolysis Bullosa (JEB), described in the German shorthaired pointer, is a remarkable spontaneous canine model for Junctional Epidermolysis Bullosa in man. In the German shorthaired pointer, JEB is caused by a homozygous substitution of the 1514C-T nucleotide. This variation in sequence results in a non-conservative change of 14 amino acids (505T-I) in domain I of laminin-5 $\alpha 3$. This non-conservative substitution modifies the hydrophobicity profile of the peptidic fragment, and therefore alters the stability of the binding between the $\alpha 3$ chain and the $\beta 3\gamma 2$ heterotrimer, which could result in a breakdown of the muted polypeptide. A fraction of muted $\alpha 3$ could be incorporated in laminin-5, modifying its function and hindering the extracellular cleavage of the $\gamma 2$ chain. Genetic complementation studies were carried out. An MMLV retrovirus expressing the whole cDNA, muted and wild, of the $\alpha 3$ chain was developed to be transduced in the keratinocytes of JEB dogs (KJEB). This phenotypic transversion was successful and brought back $\alpha 3$ chain secretion, and thus the production of functional laminin-5 molecules. In addition, the adhesion capabilities of these transduced KJEB in cultures also returned. Finally, the reconstitution of canine JEB epithelia expressing a hybrid laminin-5 is now possible, and is currently used in studies on the fate of these ex vivo grafts in JEB dogs.

Key words: junctional epidermolysis bullosa, dermatosis, dog, German shorthaired pointer, gene therapy.

• INTRODUCTION

Les épidermolyses bulleuses héréditaires (EBH) constituent un groupe hétérogène de maladies mécanobulleuses de la peau et des muqueuses, caractérisées par le développement spontané de vésicules, d'érosions et d'ulcères à la suite de traumatismes minimes et dues à la fragilité excessive de la jonction dermo-épidermique (JDE) (ORTONNE, 1992).

Le critère principal de classification des EBH de l'Homme repose sur le niveau du clivage au sein de la JDE (ORTONNE, 1992, UITTO et PULKKINEN, 2001).

- **Les EB Simples (épidermolytiques) (EBS)** sont caractérisées par un clivage intra-épidermique du à une cytolysse au sein des kératinocytes de l'assise basale. Elles sont causées pour la plupart d'entre elles, à des mutations des gènes codant pour les kératines K5 et K14.

- **Les EB Jonctionnelles (EBJ)** sont déterminées par un clivage au sein de la *lamina lucida* de la JDE. Elles sont en relation avec des anomalies du complexe hémidesmosomes / filaments d'ancrage par des mutations des gènes codant pour diverses protéines : les chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ de la laminine 5, les chaînes des laminines 6 et 7, les chaînes $\alpha 6$ et $\beta 4$ de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, la LAD-1 et ladinine, les chaînes de l'uncéine (19-DEJ-1), la protéine CD1-like et le collagène XVII (BPAG2, BP180).

- **Les EB Dystrophiques (EBD)** sont caractérisées par un clivage intra-dermique au sein des fibres d'ancrage de la

sublamina densa dermique. Elles sont dues à des mutations du gène codant pour le collagène VII des fibres d'ancrage (UITTO et PULKKINEN, 2001).

Chez le chien, seul des EBJ dues à un défaut d'expression du collagène XVII ou de la laminine 5 (OLIVRY et al, 1997, GUAGUERE et al, 1997) et des EBD causées par un défaut d'expression du collagène VII (PALAZZI et al, 2000) ont été récemment identifiées.

• PROBLÉMATIQUE

Le handicap considérable causé chez l'Homme par les EBJ et l'absence de traitement adapté justifient la mise au point d'une thérapie génique somatique pouvant s'appliquer aux formes non létales des EBJ humaines. Par ailleurs, la peau constitue un tissu privilégié pour des

essais de thérapie génique somatique : celle-ci est un organe facilement accessible, les techniques de culture des kératinocytes sont bien maîtrisées et permettent de reconstruire des épidermes artificiels (des épithéliums autologues reconstitués *in vitro* sont greffés en routine et avec succès sur des grands brûlés), la mise au point de méthodes de culture de kératinocytes ayant des propriétés de cellules souches (haut pouvoir prolifératif et de différenciation) permettent l'auto-renouvellement et le maintien à long terme des épithéliums greffés.

C'est pourquoi, il est aujourd'hui envisagé d'utiliser des épidermes génétiquement modifiés *in vitro* à des fins thérapeutiques. Des réversions phénotypiques des kérati-

Note

(1) Dihétéroxe se dit pour un parasite dont le cycle évolutif nécessite deux hôtes différents pour son évolution, dans le cas de *Leishmania* spp : un hôte vertébré et un hôte invertébré, un phlébotome.

(2) Telmophagie: mode particulier d'hématophagie souvent rencontré chez les insectes à « trompe » plutôt courte, comme les phlébotomes. L'insecte injecte de la salive. Un lac sanguin est formé dans le derme, dont le contenu est prélevé par l'insecte.

nocytes provenant des patients à EBJ *in vitro* ont été réalisées avec succès chez l'Homme (VAILLY et al, 1998, DELLAMBRA et al, 1998) et constituent une étape préliminaire à des essais de thérapies géniques.

La découverte d'un modèle canin spontané d'EBJ chez le Braque allemand a permis non seulement de caractériser cette maladie dans cette race, mais aussi et surtout de vérifier la faisabilité de l'approche de thérapie génique somatique chez l'Homme.

• ASPECTS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Cette maladie est apparue en France dans des élevages de Braque allemand au début des années 1980. Depuis, elle est régulièrement décrite en France mais aussi, récemment, en Italie. L'incidence de l'EBJ est importante dans notre pays puisque la mise au point d'un dépistage de la mutation a montré qu'en 2000, environ 13 % des reproducteurs recommandés étaient porteurs de la mutation responsable. Diverses analyses de pedigree ont montré que l'EBJ est une maladie qui se transmet selon un mode autosomal récessif dans cette race. Aucune prédisposition sexuelle n'a été observée. Généralement, plusieurs chiots de la même portée sont atteints. Une étude récente menée sur 21 cas (GUAGUERE et al, 2003) a montré que généralement l'apparition des lésions cutanées se faisait avant l'âge de 6 mois : 42,8 % des cas ont débuté à l'âge de 3 semaines, 23,8 % à 6 semaines, 23,8 % à 2 mois, 4,8 % à 4 mois et 4,8 % à 6 mois. En revanche, l'âge au diagnostic est, dans certains cas, beaucoup plus tardif puisque, dans cette série, 9,6 % des cas ont été diagnostiqués seulement à l'âge de 4 ans.

• ASPECTS CLINIQUES

L'étude citée précédemment a précisé les symptômes de cette génodermatose (GUAGUERE et al, 2003). Les lésions cutanées débutent généralement par une paronychie et une onychomadèse qui affectent plusieurs doigts. A l'âge de 2 mois, la quasi-totalité des doigts est concernée. Parallèlement, des ulcères superficiels circonscrits et plus ou moins étendus apparaissent sur la face interne des pavillons auriculaires et sur les zones de points de pression (coussinets plantaires, coudes, carpes et tarses). Le signe de Nikolsky, qui traduit un décollement dermo-épidermique, est positif. Dans 40 % des cas, des bulles et des ulcères sont observés dans la cavité buccale (gencives, face interne des babines et langue). Entre 2 et 4 mois, les lésions cutanées sont similaires mais la distribution lésionnelle est différente. Une paronychie et une onychomadèse ne sont plus rapportées que dans 75 % des cas. Les ulcères, souvent profonds et douloureux, sont observés dans 100 % des cas au niveau de la cavité orale et des points de pression, notamment sur les coussinets plantaires. Certains ulcères ont tendance à cicatrifier spontanément. Vers l'âge de un an, en plus des lésions précédentes, une onychodystrophie et une onychogryphose multi-digitées, une hypoplasie de l'émail dentaire et un net retard de croissance sont constatés. Une

forme clinique particulière caractérisée par une évolution très rapide (en 1 mois) et une atteinte muqueuse (orale et oesophagienne) quasi-exclusive a été observée chez un chiot de 7 mois. Enfin, deux cas ont été diagnostiqués sur des Braques allemands adultes (âgés de 4 ans) alors que les lésions étaient apparues dès l'âge de 2 mois. Les symptômes se caractérisent par l'apparition ou la présence d'ulcères chroniques circonscrits sur les coussinets plantaires, le scrotum, les mamelles et aussi, par une usure prématurée des dents et des lésions orales cicatricielles. Dans ces deux cas, les ulcères moins douloureux sont compatibles avec un mode de vie aménagé. Le pronostic de la maladie est très mauvais. La quasi-totalité des animaux atteints a été euthanasiée rapidement après le diagnostic. Trois d'entre eux sont encore vivants grâce à une vie aménagée.

Cette étude a permis, semble-t-il, de caractériser différents phénotypes de l'EBJ chez le Braque allemand, une forme aiguë observée chez les chiots et les jeunes adultes d'évolution rapide et fatale, une forme chronique moins grave et compatible avec une vie aménagée et, enfin, une forme quasi-exclusivement muqueuse (GUAGUERE et al, 2003).

• ASPECTS HISTOPATHOLOGIQUES

L'examen histopathologique conventionnel de biopsies cutanées prélevées à la périphérie des ulcères ou sur peau frottée montre un clivage dermo-épidermique évoluant en dehors de tout contexte inflammatoire. Il ne peut pas préciser le niveau de clivage au sein de la JDE.

Des examens immunohistochimiques utilisant des anticorps dirigés contre un certain nombre de constituants du complexe hémidesmosome/filaments d'ancrage (notamment contre les intégrines $\alpha 4 \beta 6$ et le collagène IV) sont alors nécessaires et confirment que le clivage dermo-épidermique se situe au sein de la *lamina lucida*.

• ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX

L'examen ultrastructural à transmission confirme que le clivage dermo-épidermique se situe au sein de la *lamina lucida*. Par ailleurs, le nombre et la taille des hémidesmosomes sont normaux (MENEGUZZI, 1999).

• ASPECTS MOLÉCULAIRES

Analyse de l'expression des constituants de la JDE par immunofluorescence sur coupes de peau

Les anticorps polyclonaux SE85, SE144 et anti- $\beta 3$, dirigés respectivement contre les chaînes humaines $\alpha 3$, $\gamma 2$, $\beta 3$ de la laminine 5, reconnaissent les polypeptides canins. Chez les chiens témoins, ces anticorps donnent un marquage linéaire continu de la JDE. Chez les chiens EBJ, le marquage de la peau lésionnelle par les anticorps SE85, SE144 et anti- $\beta 3$ se localise sur le plancher des bulles, ce qui confirme le diagnostic d'EBJ. Dans la peau lésionnelle, le marquage par l'anticorps anti- $\beta 3$ est

d'une intensité comparable à celui obtenu chez les chiens témoins. En revanche, le marquage obtenu avec les anticorps SE85 et SE144 apparaît discontinu et moins intense que celui obtenu chez les chiens témoins. Le marquage des anticorps 233 et 1A8C dirigés respectivement contre les domaines extra- et intra-cellulaires du collagène XVII humain est normalement exprimé dans la peau des chiens EBJ. De même, tous les autres anticorps spécifiques des différents composants humains de la JDE ont réagi positivement chez les chiens EBJ (SPIRITO et al, 1999, SPIRITO et al, 2002).

Analyse par immunofluorescence des cultures de kératinocytes de chiens EBJ

Une analyse par immunofluorescence des cultures de kératinocytes des chiens EBJ a été réalisée pour vérifier l'expression et la sécrétion des trois chaînes de la laminine 5 par les kératinocytes EBJ (KEBJ). Les anticorps utilisés sont les mêmes que pour l'étude précédente. La présence de traces fluorescence détectées par l'anticorps anti- β 3 autour des KEBJ confirme la sécrétion, dans la matrice extra-cellulaire de la chaîne β 3 par ces cellules. En revanche, le marquage obtenu sur les KEBJ à l'aide des anticorps SE85 et SE144 est très diminué par rapport à celui obtenu sur les kératinocytes témoins (KT). De plus, le signal observé avec ces deux anticorps est plutôt intra-cellulaire, le marquage extra-cellulaire étant parfois absent. Ces résultats suggèrent que l'expression des chaînes α 3 et γ 2 de la laminine 5 est altérée chez les chiens EBJ et qu'une rétention cytoplasmique de ces deux polypeptides est observée. Les chaînes α 3 et γ 2 ne sont donc pas déposées correctement dans la matrice extra-cellulaire (SPIRITO et al, 1999, SPIRITO et al, 2002).

Analyse par western-blot de la laminine 5 exprimée par les kératinocytes de chiens EBJ

Une analyse par western-blot à partir de milieux de culture conditionnés par les KEBJ a été réalisée pour vérifier les niveaux d'expression et de sécrétion de la laminine 5 chez les chiens EBJ. Les bandes spécifiques identifiées par les anticorps anti- β 3 et SE85 montrent que la quantité des chaînes α 3 et β 3 est fortement diminuée dans les milieux conditionnés par les KEBJ par rapport à celle des milieux conditionnés par les KT. L'anticorps SE144 identifie deux bandes, l'une à 155 kDa et l'autre à 105 kDa, correspondant respectivement aux formes non clivée et clivée de la chaîne γ 2 de la laminine 5. Dans le milieu de culture conditionné par les KT, la forme clivée (105 kDa) est majoritaire par rapport à la forme non clivée (155 kDa), alors que dans les milieux de culture des KT, la forme non clivée est majoritaire. Cependant, la quantité totale de chaîne γ 2 sécrétée par les KEBJ et les KT semble identique. Ces résultats révèlent une sécrétion diminuée des chaînes β 3 et α 3 de la laminine 5 dans les milieux de culture des KEBJ. De plus, la maturation de la chaîne γ 2 semble entravée (SPIRITO et al, 1999), SPIRITO et al, 2002).

Analyse par immunoprécipitation de la laminine 5 sécrétée par les kératinocytes de chiens EBJ

Une analyse par immunoprécipitation de la laminine 5 a été réalisée à partir des milieux de culture conditionnés par les cellules KEBJ et KT, à l'aide des anticorps polyclonaux SE85, SE144 et anti- β 3. La laminine 5 étant sécrétée sous forme d'hétérotrimère par les KT, les trois chaînes sont co-précipitées en quantité stoechiométrique. En revanche, celles-ci sont précipitées de façon non stoechiométrique par les anticorps anti- β 3 et SE144. En effet, l'anticorps anti- β 3 précipite une quantité de chaîne β 3 et γ 2 nettement supérieure à la quantité de chaîne α 3. La quantité de chaîne β 3 est supérieure à celle de la chaîne γ 2. Par ailleurs, l'anticorps SE144 précipite une quantité de chaîne γ 2 non clivée (γ 2nc) supérieure aux chaînes β 3 et α 3. De plus, la forme clivée de la chaîne γ 2 (γ 2c) semble se trouver en quantité très faible. Enfin, l'anticorps SE85 ne précipite qu'une quantité presque indétectable de laminine 5. Ces résultats montrent que chez les chiens EBJ, la quantité de laminine 5 sécrétée sous forme trimérique est très faible et qu'elle correspond vraisemblablement à la quantité de chaîne α 3 détectée dans le milieu à l'aide des anticorps anti- β 3 et SE144. Dans les milieux conditionnés par les KEBJ, des chaînes β 3 et γ 2 sont donc présentes sous forme monomérique ou hétérodimérique (SPIRITO et al, 1999, SPIRITO et al, 2002).

• ASPECTS GÉNÉTIQUES

Recherche de mutation sur les ADNc de la chaîne γ 2 de la laminine 5

Le séquençage de l'ADNc codant pour la chaîne γ 2 chez les chiens EBJ a identifié un seul changement de nucléotide par rapport à la séquence canine témoin. Cette variation de séquence, en position 171 (171T-C) n'induit aucun changement d'acide aminé. Par ailleurs, deux polymorphismes hétérozygotes ont été identifiés en position 2522 et 2611. L'hétérozygotie des allèles du gène LAMC2 chez les chiens EBJ exclut l'implication de ce gène dans la maladie, à transmission autosomale récessive (CAPT, 1999).

Recherche de mutation sur les ADNc de la chaîne α 3 de la laminine 5

Le séquençage de l'ADNc codant pour la chaîne α 3 chez les chiens EBJ a identifié une substitution homozygote du nucléotide 1514 C-T chez les chiens EBJ. Cette variation de séquence induit un changement non conservatif de 14 acides aminés (505T-I) dans le domaine I de la laminine α 3. Cette substitution non conservative modifie le profil d'hydrophobicité du fragment peptidique et altère donc la stabilité d'association de la chaîne α 3 avec l'hétérotrimère β 3 γ 2. Ceci pourrait aboutir à une dégradation du polypeptide muté, comme cela a été démontré chez l'Homme dans certaines formes d'EBJ (McGRATH et al, 1996). Une fraction d' α 3 mutée pourrait s'incorporer dans la laminine 5, en altérer le fonctionnement et entraver le

clivage extra-cellulaire de la chaîne $\gamma 2$. La transmission mendélienne du changement 1514 C-T a été vérifiée par le séquençage de fragments de l'ADN génomique extrait à partir du sang des membres de la famille des chiens EBJ. Ce changement a été retrouvé à l'état homozygote chez les chiens EBJ. Les parents sont hétérozygotes pour ce changement. Ceci a été à l'origine de la mise au point d'un test de dépistage de la mutation (SPIRITO et al, 1999, SPIRITO et al, 2002).

Test de complémentation génétique

Des expériences de complémentation génétique ont donc été réalisées. Pour cela, un rétrovirus MMLV exprimant l'ADNc entier muté et sauvage de la chaîne $\alpha 3$ a été construit pour être transduit dans les KEBJ. Cette transversion phénotypique a été réussie et a permis aux KEBJ de sécréter de nouveau la chaîne $\alpha 3$ et ainsi, de produire des molécules de laminine 5 fonctionnelles. Par ailleurs, ces KEBJ transduits ont montré aussi la restauration de leur capacité d'adhésion en culture. Enfin, la reconstitution d'épithéliums canins EBJ exprimant une laminine 5

hybride est désormais possible et est actuellement à l'origine d'études sur le devenir de ces greffes *ex vivo* chez des chiens EBJ. Ces études permettront aussi de surveiller l'éventuelle apparition d'une réaction immunitaire mimant une maladie auto-immune dans laquelle sont produits des anticorps dirigés contre la laminine 5 (SPIRITO et al, 2003).

• CONCLUSION

Un modèle spontané de l'EBJ de l'Homme a été caractérisé chez le Braque allemand. Les travaux de réversion phénotypique sur les kératinocytes serviront de modèle pour la thérapie génique, non seulement dans le cas des EBJ, mais aussi dans le cadre d'autres maladies héréditaires monogéniques impliquant des composants de la matrice extra-cellulaire et des protéines structurales et multi-fonctionnelles (SPIRITO et al, 2001).

Par ailleurs, la mise au point de ce modèle spontané est un bel exemple de collaboration entre vétérinaires, médecins et biologistes.

BIBLIOGRAPHIE

- CAPT A (1999) *Caractérisation génétique d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle canine : système modèle pour la thérapie des génodermatoses*. DEA de Pharmacologie et Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences et Techniques, 29 p.
- DELLAMBRA E, VAILLY J, PEL-LIGRINI G, BONDANZA S, GOLISANO O, MACCHIA C, ZAMBRUNO G, MENEGUZZI G, De LUCA M (1998) Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5 dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther.*, **9**, 1359-1370.
- GUAGUERE E, OLIVRY T, POUJADE-DELVERDIER A, MAGNOL JP (1997) Epidermolyse bulleuse jonctionnelle familiale associée à une absence d'expression du collagène XVIII (BPAG2, BP180) chez le Braque Allemand : à propos de deux cas. *Prat Méd Chir Anim Comp.*, **32**, 471 - 480.
- GUAGUERE E, SPIRITO F, CAPT A, ORTONNE JP, MENEGUZZI G (2003) Hereditary junctional epidermolysis in the german shorthaired pointer : An epidemiology and clinical prospective study of 21 cases. *Vet Dermatol.*, (accepted for publication)
- McGRATH J, GATALICA B, LI K, DUNNIL G, McMILAN R, CHRISTIANO AM, EADYRA, UITTO J (1996) Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication in the type XVII collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition. *Am J Pathol.*, **148**, 1787-1796.
- MENEGUZZI G (1999) Travaux non publiés.
- OLIVRY T, POUJADE-DELVERDIER A, DUNSTON SM, FINE JD, ORTONNE JP, (1997) Absent expression of collagène XVII (B'PAG2, BP180) in canine familial localized junctional epidermolysis bullosa. *Vet Dermatol.*, **8**, 203-212.
- ORTONNE JP (1992) La jonction dermo-épidermique et sa pathologie acquise et héréditaire. *Pathol Biol.*, **40**, 121 - 132.
- PALAZZI X, MARCHAL T, CHABANNE L, SPADAFORA A, MAGNOL JP, MENEGUZZI G (2000) Inherited dystrophic epidermolysis bullosa in inbred dogs : a spontaneous animal model for somatic gene therapy. *J Invest Dermatol.*, **115**, 135-137.
- SPIRITO F, CAPT A, GUAGUERE E, GAY-BATAILLE E, ORTONNE JP, MENEGUZZI G (2003) A canine Model for in vivo gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Vet Dermatol.*, (accepted for publication)
- SPIRITO F, CAPT A, ORTONNE JP, GUAGUERE E, MENEGUZZI G (1999) Genetic bases of canine junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.*, **113**, 1139 (abstract)
- SPIRITO F, CAPT A, ORTONNE JP, GUAGUERE E, MENEGUZZI G (2002) Identification of the genetic basis of canine junctional epidermolysis bullosa in the german shorthaired pointer. In THODAY KL, FOIL CS, BOND R editors. *Advances in veterinary dermatology*, volume 4, Blackwell Publishing, 300.
- SPIRITO F, MENEGUZZI G, DANOS O, MEZZINA M. (2001) Cutaneous gene transfer and therapy : the present and the future. *J Gene Med.*, **3**, 21-31.
- UITTO J, PULKKINEN L (2001) Molecular genetics of heritable blistering disorders. *Arch Dermatol.*, **137**, 1458-1461.
- VAILLY J, GAGNOUX-PALACIOS L, DELLAMBRA E, ROMERO C, PINOLA M, ZAMBRUNO G, De LUCA M., ORTONNE JP, MENEGUZZI G. (1998) Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia *Gene Ther.*, **5**, 1322- 1332.