

## À propos des anticorps anti-PCNA

Daniela Lakomy<sup>a,\*</sup>, Joëlle Goetz<sup>b,\*\*</sup>

### 1. Introduction

Certaines protéines participant aux phases de croissance/prolifération cellulaire (phases G1, G2 du cycle cellulaire) et/ou de réplication de l'ADN (phase S du cycle cellulaire) peuvent être les cibles d'anticorps (Ac) antinucléaires. Les premiers, décrits en 1978, sont les Ac anti-protéine auxiliaire de l'ADN polymérase  $\delta$ , mieux connus sous le nom d'Ac anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) [1]. D'autres Ac dirigés contre des protéines nucléaires exprimées en phase G1, G2 et/ou S ont été observés par la suite et appelés Ac anti-pseudo-PCNA de par leur marquage voisin mais différent des Ac anti-PCNA en immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEP-2 [2-4].

Pour chacun de ces Ac rares, nous décrivons les antigènes cibles, leurs méthodes de détection et d'identification et leur intérêt en pathologie humaine.

### 2. Anticorps anti-PCNA

Les Ac anti-PCNA ont été identifiés en 1978 par immunodiffusion double selon Ouchterlony dans le sérum de 3 patients sur 70 ayant un lupus érythémateux systémique (LES). Ces trois sérums testés avec un extrait de thymus de lapin donnaient une ligne de précipitation différente des autres Ac antinucléaires (ANA) connus. En IFI, on observait un aspect moucheté pléiomorphe des cellules HEP-2 et des lymphocytes stimulés. Ces Ac réagissaient donc avec un antigène nucléaire présent dans les cellules en prolifération [1].

#### 1.1. Antigène cible des Ac anti-PCNA

##### a Laboratoire d'immunologie

Centre hospitalier universitaire  
2, rue Angélique-Ducoudray  
21070 Dijon cedex

##### b Laboratoire d'immunologie

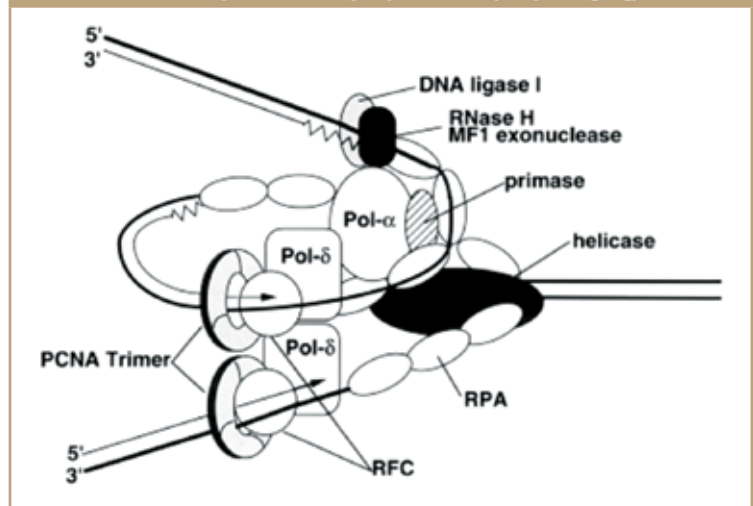
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg – Nouvel Hôpital Civil  
1, place de l'Hôpital  
67091 Strasbourg cedex

##### Correspondance

\* daniela.lakomy@chu-dijon.fr

\*\* joelle.goetz@chru-strasbourg.fr

Figure 1 – La protéine PCNA et le complexe ADN-polymérase (d'après [14]).



La cible antigénique des Ac anti-PCNA est une protéine de 34 kDa, très bien conservée au cours de l'évolution. Il s'agit de la protéine auxiliaire de la polymérase  $\delta$  de l'ADN, impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN. La protéine PCNA, active sous forme trimérique, constitue une pince glissante qui encercle la double hélice de l'ADN permettant l'avancement de la polymérase le long de l'ADN (figure 1). En plus de la polymérase  $\delta$  de l'ADN, la protéine-cible antigénique PCNA interagit avec de nombreux autres partenaires facilitant leurs interactions avec l'ADN. Ainsi, elle agit comme un échafaudage pour moduler des interactions protéiques impliquées dans la réparation de l'ADN au cours de la réplication. Son expression, dépendante du cycle cellulaire, augmente proportionnellement avec la synthèse de l'ADN [5, 6].

#### 1.2. Méthodes de détection et d'identification des Ac anti-PCNA

##### 1.2.1. Immunofluorescence indirecte

En pratique courante, la découverte des Ac anti-PCNA se fait à l'occasion d'une demande d'ANA, lors de l'étape de dépistage par IFI sur cellules HEP-2. L'aspect observé est pléiomorphe, avec une fluorescence mouchetée de 30 à 60 % des cellules, comportant des grains de taille et de répartition variables, avec un marquage nucléolaire inconstant, mais sans marquage des cellules en mitose [7] (figure 2). Cet aspect est dû à la reconnaissance de l'antigène cible exprimé en phase S du cycle cellulaire. L'aspect de fluorescence peut être masqué par la coexistence d'autres autoanticorps qui donnent une fluorescence homogène ou mouchetée intense, rendant difficile l'identification de l'aspect PCNA [8].

Au cours du LES, les titres de fluorescence sont le plus souvent supérieurs à 640 [9].

### 1.2.2. Méthodes d'identification des Ac anti-PCNA

Il existe plusieurs techniques : immunodiffusion double selon Ouchterlony, immunodot, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), FEIA (fluoroenzymeimmunoassay), ALBIA (addressable laser bead assay), NALIA (filtration assisted nanodot array luminometric immunoassay), LIA (line immunoassay) et une grande diversité de kits d'identification des Ac anti-PCNA. La plupart des techniques utilisent un antigène recombinant humain. Les épitopes reconnus sont principalement conformationnels [8]. En ce qui concerne la sensibilité entre les techniques, une étude récente a comparé trois techniques (ELISA, ALBIA et LIA) et leur a trouvé des performances proches [8].

Le plus souvent, les Ac anti-PCNA ne sont pas isolés, mais retrouvés en association avec d'autres autoanticorps, associés ou non au LES [8].

Les Ac anti-PCNA peuvent disparaître au cours de l'évolution de la maladie notamment après un traitement immunosuppresseur [10].

Entre la méthode d'identification par IFI sur cellules HEp-2 et les méthodes de détection il peut y avoir des discordances, possibles dans les deux sens :

- aspect PCNA en IFI et résultats négatifs par les méthodes d'identification, situation qui peut correspondre à la reconnaissance en IFI d'une autre cible antigénique faisant partie du même complexe multiprotéique que l'antigène cible PCNA [8]. Cette situation peut correspondre également à une difficulté de lecture en IFI et à la non reconnaissance d'un aspect pseudo-PCNA ;

- pas d'aspect PCNA en IFI et résultats positifs par les méthodes d'identification, situation qui peut être due à la présence d'une fluorescence qui masque l'aspect PCNA [5, 8, 11] ou bien une réaction non spécifique qui nécessite le recours à une deuxième technique d'identification.

### 1.3. Signification clinique des Ac anti-PCNA

Il s'agit d'autoanticorps rares, avec une prévalence < 5 % dans le LES et une prévalence en IFI de 0,07 % en considérant des sérums non sélectionnés [8, 11].

Depuis leur découverte, plusieurs publications ont rapporté les Ac anti-PCNA comme étant des marqueurs spécifiques de LES [1, 10, 12-16].

Néanmoins, ces Ac ont été décrits dans des maladies auto-immunes autres que le LES (comme par exemple la sclérodémie, le syndrome de Gougerot-Sjögren ou les thyroïdites auto-immunes) et également dans des pathologies comme l'hépatite virale ou les cancers [8, 9, 17-19]. Des publications plus récentes, utilisant des techniques plus courantes que l'immunodiffusion selon Ouchterlony, n'ont pas retrouvé une association aussi forte entre les Ac anti-PCNA et le LES (*tableau I*) [8, 9, 11, 20].

## 2. Anticorps anti-pseudo-PCNA

C'est à partir d'un sérum de patient ayant un cancer de la vessie et du poumon que G. Landberg a décrit un nouvel antigène nucléaire appelé SG2NA [2]. En IFI le sérum donne un aspect moucheté dense du noyau dont l'intensité varie selon les cellules. L'étude en cytométrie en flux a permis de conclure que les cellules marquées

Tableau I – Signification clinique des anticorps anti-PCNA.

Auteur-Année Référence	Techniques	Cas de LES Résultats	Cas de non LES Résultats
Miyachi K, et al. 1978 [1]	IFI Immunodiffusion	70 LES dont 3 PCNA +	PCNA- pour : 30 PR, 33 SGS, 10 ScS, 19 PM, 26 sujets sains
Fritzler MJ, et al. 1983 [10]	Immunodiffusion	7 patients PCNA+ dont 5 LES	7 patients PCNA+ dont 1 GNPDI idiopathique et 1 arthrite séronégative
Nojima Y, et al. 1996 [17]	IFI Immunodiffusion		Présentation de 2 cas de sclérodémies PCNA+
Tzang BS, et al. 1999 [19]	ELISA (antigène recombinant)	80 LES dont 5 PCNA +	243 hépatites B dont 30 PCNA+ 379 hépatites C dont 71 PCNA+ PCNA- pour : 28 PR, 15 SGS, 8 PM, 8 CBP, 33 sujets sains
Kogure T, et al. 2002 [14]	Immunoblot Immunoprécipitation ELISA maison	560 LES dont 8 PCNA +	
Beyne-Rauzy O, et al. 2005 [16]	IFI Immunodiffusion	12 PCNA + dont 12 LES	
Vermeersch P, et al. 2009 [9]	IFI Dot maison	29 PCNA + dont 2 LES	29 PCNA+ dont : 6 thyroïdites auto-immunes, 2 PPR, 1 HAI, 1 ScS, 1 arthrite psoriasique
Mahler M, et al. 2010 [8]	LIA ( <i>line immunoassay</i> )	374 LES dont 10 PCNA + (2,7%)	60 SGS dont 3 PCNA+ (5 %) 48 PM : 1 PCNA+ 100 ScS : 1 PCNA+ PCNA- pour 150 patients (50 maladies de Crohn, 50 maladies cœliaques et 50 sujets sains)

PR = polyarthrite rhumatoïde, SGS = Gougerot-Sjögren, GNPDI = glomérulonéphrite proliférative diffuse, CBP = cirrhose biliaire primitive, PPR = pseudopolyarthrite rhizomélique, HAI = hépatite auto-immune, PM = polymyosite, ScS = sclérodémie systémique.

Figure 2 – Ac anti-PCNA (IFI sur HEp-2).

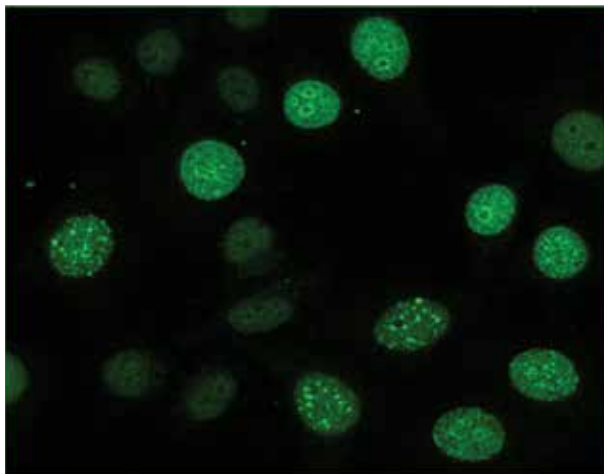


Figure 3 – Ac anti-pseudo-PCNA de type 1 (IFI sur HEp-2).

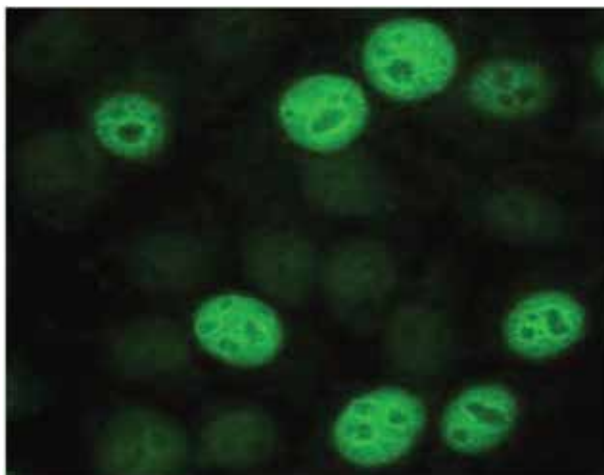
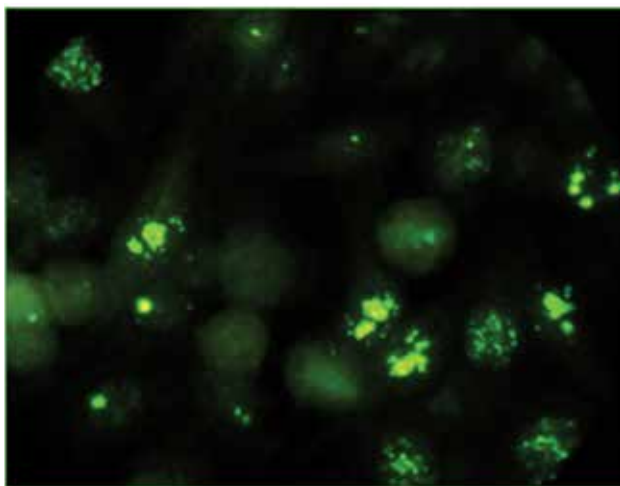


Figure 4 – Ac anti-pseudo-PCNA de type 2 (IFI sur HEp-2).



sont en phase S et surtout en phase G2 du cycle cellulaire d'où le nom donné à la cible de ces ANA qui ont été appelés par la suite Ac anti-pseudo-PCNA de type 1 vu le marquage pléiomorphe [3].

Un autre aspect pléiomorphe de type nucléolaire associé ou non à un marquage du nucléoplasme a été décrit par M. Zuber et R.L. Humbel dans le sérum d'un patient greffé de moelle pour le premier, d'une patiente ayant un cancer pulmonaire pour le second [3, 4].

Les anticorps correspondants ont été appelés Ac anti-pseudo-PCNA de type 2 [3].

## 2.1. Antigènes cibles des anticorps anti-pseudo-PCNA

### 2.1.1. Cible des Ac anti-pseudo-PCNA de type 1

Un an après la première description par IFI sur cellules HEp-2 des Ac anti-SG2NA, Y. Muro montre que l'antigène G2SNA est un polypeptide nucléaire de 713 acides aminés et comportant 6 domaines WD-40 [21].

Encore appelé striatine 3, le G2SNA dont il existe différents isoformes est une protéine d'échafaudage de la famille des striatines. Principalement exprimé dans le système nerveux central, il partage avec les deux autres membres de la famille (la striatine et la zinedine) quatre domaines d'interactions protéiques : des motifs répétés WD40, un domaine de liaison à la cavéoline, un autre à la calmoduline et une structure *coiled-coil*, agencés dans le même ordre et très conservés au cours de l'évolution [21-24].

Le G2SNA intervient ainsi dans

- le trafic cellulaire de par sa liaison à la phosphatase 2A (PP2A) ;
- la transcription : les motifs WD40 de l'extrémité C-terminale inhibent son activation, ceux de la région N-terminale agissent comme un puissant activateur [25].

### 2.1.2. Cible des Ac anti-pseudo-PCNA de type 2

Plusieurs équipes ont décrit des ANA donnant une fluorescence nucléolaire pléiomorphe principalement des cellules en phase G1S, S et G2 du cycle cellulaire avec un marquage des chromosomes durant la mitose associé ou non à un aspect moucheté du nucléoplasme [3, 4, 26-28]. En 1999, Savino identifie la protéine Nop52 comme une cible de ces anticorps. Présente dans le composant granulaire du nucléole pendant l'interphase, à la périphérie des chromosomes pendant la mitose, et dans les corps PNB (prenucleolar body) à la transition télophase/G1, la protéine Nop52 intervient dans l'assemblage du nucléole lors de la reformation du noyau après la mitose [27].

## 2.2. Méthodes de détection et d'identification des Ac anti-pseudo-PCNA

### 2.2.1. Les Ac anti-pseudo-PCNA de type 1

Ils sont détectés par IFI sur cellules HEp-2. Ils sont caractérisés par une fluorescence mouchetée faite de grains fins, denses, des noyaux en phase proliférative, les autres cellules ne sont pas marquées. Cet aspect diffère

cependant de celui lié à la présence d'Ac anti-PCNA qui est plus polymorphe dans la taille des grains et leur nombre (figures 2 et 3). Il n'existe aucune technique d'identification de ces Ac en routine.

### 2.2.2. Les Ac anti-pseudo-PCNA de type 2

Détectés par IFI sur cellules HEP-2, ils marquent les nucléoles des cellules prolifératives, la périphérie des chromosomes des cellules en mitose et accessoirement le nucléoplasme sous forme de grains de taille variable et irréguliers (figure 4). À l'heure actuelle il n'existe aucune technique d'identification de ces anticorps en routine.

## 2.3. Intérêt des Ac anti-pseudo-PCNA en pathologie humaine

Si les Ac anti-pseudo-PCNA de patients ayant une affection maligne ont permis de mettre en évidence de nouveaux antigènes nucléaires, la littérature est pauvre en ce qui concerne la signification clinique de ces anticorps.

### 2.3.1. Les Ac anti-pseudo-PCNA de type 1

Les Ac anti-pseudo-PCNA de type 1 ont été observés dans quelques cas de cancer du sein, du colon, mais également chez des sujets n'ayant pas de néoplasie [26].

Une étude rétrospective concernant la signification clinique de ces Ac est actuellement en cours au CHU de Strasbourg. Sur 54894 sérums testés en routine pour les ANA de mai 2006 à février 2013, les Ac anti-pseudo-PCNA de type 1 sont plus fréquents (0,55 %) que les Ac anti-PCNA (0,015 %).

L'étude des dossiers cliniques de 78 patients montre que :

- parmi 48 patients issus des services de rhumatologie et médecine interne/immunologie clinique, 15 % ont un antécédent personnel de cancer, 70 % ont des maladies auto-immunes [29];
- parmi 30 malades suivis au service d'oncohématologie, les hémopathies malignes prédominent, les cytopénies auto-immunes sont faiblement représentées.

Ces résultats préliminaires doivent être complétés par la consultation des dossiers des patients des autres spécialités (neurologie, néphrologie...) mais confirment que ces Ac ne sont pas associés aux seules pathologies malignes.

### 2.3.2. Les Ac anti-pseudo-PCNA de type 2

Les Ac anti-pseudo-PCNA de type 2 ont été observés par IFI sur cellules HEP-2 dans quelques cas de cancer du pancréas ou du colon mais aussi chez des patients ayant une connectivité [26, 28]. Dans notre expérience nous n'avons observé cet aspect que chez une malade sans pathologie maligne.

Des Ac anti-Nop52 ont été mis en évidence par immunoblot chez des patients ayant une connectivité inclassée, un syndrome de Raynaud ou un lupus systémique sans image de type anti-pseudo-PCNA de type 2 mais de type moucheté pléiomorphe.

D'autres études incluant des échanges inter-laboratoires de sérums contenant de tels anticorps sont nécessaires pour préciser l'expression de l'antigène cible dans les différentes préparations de cellules HEP-2 et mieux cerner la valeur diagnostique et/ou pronostique de ces anticorps en pathologie humaine.

## 3. Conclusion

Les anticorps de type PCNA ou pseudo-PCNA sont des anticorps rares, bien distincts les uns des autres en IFI sur cellules HEP-2 malgré leur aspect pléiomorphe proche. S'il existe des techniques d'identification en routine pour les Ac anti-PCNA, ce n'est pas le cas pour les Ac anti-pseudo-PCNA.

En pratique médicale courante, l'association entre Ac anti-PCNA et LES semble moins forte avec les techniques utilisées actuellement, la signification clinique des Ac anti-pseudo-PCNA reste à préciser.

**Déclaration d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

## Références

- [1] Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121(6):2228-34.
- [2] Landberg G, Tan EM. Characterization of a DNA-binding nuclear autoantigen mainly associated with S phase and G2 cells. *Exp Cell Res* 1994;212(2):255-61.
- [3] Humbel RL. Images de fluorescence. In: Auto-anticorps et maladies auto-immunes. Collection OptionBio 2<sup>e</sup> édition. Elsevier Ed 1997.
- [4] Zuber M. Characterization of a cell cycle-dependent nuclear autoantigen. *Mol Biol Rep* 1996;23(3-4):197-203.
- [5] Takasaki Y, Kogure T, Takeuchi K, et al. Reactivity of anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) murine monoclonal antibodies and human autoantibodies to the PCNA multiprotein complexes involved in cell proliferation. *J Immunol* 2001;166:4780-7.
- [6] Maga G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Science* 2003;116:3051-60.
- [7] Humbel RL. Des aspects les plus courants sur HEP-2 aux plus rares. Bio-Rad Laboratories Inc. 2011.
- [8] Mahler M, Silverman ED, Fritzler MJ. Novel diagnostic and clinical aspects of anti-PCNA antibodies detected by novel detection methods. *Lupus* 2010;19 (13):1527-33.
- [9] Vermeersch P, Op De Beeck K, Lauwerys BR, et al. Antinuclear antibodies directed against proliferating cell nuclear antigen are not specifically associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2009;68 (11):1791-3.
- [10] Fritzler MJ, McCarty GA, Ryan JP, et al. Clinical features of patients with antibodies directed against proliferating cell nuclear antigen. *Arthritis Rheum* 1983;26:140-5.
- [11] Mahler M, Miyachi K, Peebles C, et al. The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Autoimmun Rev* 2012;11:771-5.
- [12] Takasaki Y, Fishwild D, Tan EM. Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J Exp Med* 1984;159:981-92.
- [13] Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989;44:93-152.
- [14] Kogure T, Takasaki Y, Takeuchi K, et al. Autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes involved in cell proliferation are strongly associated with their structure and biologic function in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46 (11):2946-56.
- [15] Kaneda K, Takasaki Y, Takeuchi K, et al. Autoimmune response to proteins of proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol* 2004;31:2142-50.

- [16] Beyne-Rauzy O, Thebault S, Adoue D, et al. Anti-PCNA antibodies: prevalence and predictive value. *Joint Bone Spine* 2005;72:432-5.
- [17] Nojima Y, Mimura T, Hamasaki K, et al. Chronic intestinal pseudoobstruction associated with autoantibodies against proliferating cell nuclear antigen. *Arthritis Rheum* 1996;39(5):877-9.
- [18] Takahashi T, Takasaki Y, Takeuchi K, et al. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in peripheral blood mononuclear cells and sera of patients with malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1997;28:113-25.
- [19] Tzang BS, Chen TY, Hsu TC, et al. Presentation of autoantibodies to proliferating cell nuclear antigen in patients with chronic hepatitis B and C virus infection. *Ann Rheum Dis* 1999;58:630-4.
- [20] Vermeersch P, Bossuyt X. Prevalence and clinical significance of rare antinuclear antibody patterns. *Autoimmun Rev* 2013;12(10):998-1003.
- [21] Muro Y, Chan EKL, Landberg G, et al. A cell-cycle nuclear autoantigen containing WD-40 motifs expressed mainly in S and G2 phase cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207(3):1029-37.
- [22] Moreno CS, Park S, Nelson K, et al. WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 2000 25;275(8):5257-63.
- [23] Sanghamitra M, Talukder I, Singarapu N, et al. WD-40 repeat protein SG2NA has multiple splice variants with tissue restricted and growth responsive properties. *Gene* 2008;420(1):48-56.
- [24] Tanti GK, Singarapu N, Muthuswami R, et al. Among the three striatin family members, SG2NA was first to arise during the evolution. *Front Biosci (Schol Ed)* 2014;6:1-15.
- [25] Zhu W, Chan EK, Li J, et al. Transcription activating property of autoantigen SG2NA and modulating effect of WD-40 repeats. *Exp Cell Res* 2001;269(2):312-21.
- [26] Humbel RL. Anticorps antinucléaires et cancer. *Rev Fr Lab* 2010;424bis:27-31.
- [27] Savino TM, Bastos R, Jansen E, et al. The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J Cell Sci* 1999;112(12):1889-900.
- [28] Swart A, Mahler C, Fritzier MJ. The cell cycle protein Nop52 is a candidate target autoantigen. [www.fooke-labs.de](http://www.fooke-labs.de).
- [29] Dima A, Gorse A, Martin T, et al. Anti-pseudo-PCNA autoantibodies: clinical and biological correlates in a single center cohort of 48 patients. *Eur J Internal Med* 2013;24(sup1):e234-5.