

Le point sur les anticorps anti-DFS70

Sylvie Coito^{a,*}

1. Historique

Les anticorps anti-DFS70 ont été initialement décrits en 1994 par Ochs et al. [1] qui ont observé en immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEP-2 un marquage granulaire dense des noyaux en interphase et des chromosomes condensés en mitose, donnant ainsi à ces anticorps le nom de DFS pour dense fine speckles. En immunoblot, ces anticorps réagissent avec une protéine des noyaux des cellules MOLT-4, d'environ 70 kDa, d'où son nom de DFS70. Enfin, le sérum du patient a été utilisé pour cribler une banque d'expression d'ADNc d'une lignée de cellules du cancer de la vessie, conduisant à isoler un gène codant pour une protéine dont la séquence est identique à celle du coactivateur de transcription p75, également décrit sous le nom de lens epithelium-derived growth factor p75 (LEDGF/p75) [2].

Actuellement, cette protéine est impliquée dans de nombreux processus pathologiques sans être pour autant spécifique d'une maladie.

La plus grande prévalence des anticorps anti-DFS70 a été décrite chez les patients souffrant du syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (66,7 %) et de dermatite atopique (30 %) et chez des sujets apparemment sains (10 %) alors que leur prévalence dans les maladies rhumatismales chroniques systémiques est significativement plus faible (2-3 %).

2. Structure

La séquence génétique de DFS70-LEDGF/p75 est située sur le chromosome 9p22.2. La protéine est exprimée de façon ubiquitaire dans les noyaux.

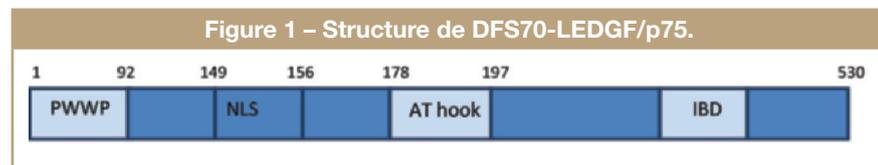
La protéine LEDGF/p75 contient 530 acides aminés et a plusieurs domaines fonctionnels. Elle appartient à la famille des HDGF (hepatoma-derived growth factor). Son extrémité N-terminale est une séquence riche en résidus proline et tryptophane (PWWP), un motif retrouvé dans de nombreuses protéines associées à la chromatine et

qui sont impliquées dans la croissance cellulaire, la transcription et les liaisons à l'ADN. Au centre de la molécule, la protéine LEDGF/p75 possède un signal de localisation nucléaire NLS (nuclear localization signal), un domaine Tat-like, le transactivateur de la transcription, un domaine HTH (helix-turn-helix), un domaine AT-hook et enfin une séquence BLZ ou Basique Leucine-Zipper.

Alors que la séquence NLS intervient dans la signalisation des protéines dans le noyau, la séquence Tat est impliquée dans le transport de protéines vers la membrane cytoplasmique, conférant ainsi à cette protéine un rôle de protéine sécrétrice. Les motifs BLZ, HTH, et AT-hook sont habituellement retrouvés dans les facteurs de transcription et dans les protéines liant l'ADN et sont en général impliqués dans les interactions protéines-protéines et protéines-ADN.

Enfin, l'extrémité C-terminale permet de différencier deux isoformes (p75 et p52) par épissage alternatif du précurseur de l'ARNm du LEDGF/p75.

Les déterminants antigéniques de la protéine LEDGF/p75 ont été localisés au niveau de l'extrémité C-terminale de la molécule et sur une séquence couvrant les résidus d'acides aminés 326 à 486 (*figure 1*).



3. Rôle du LEDGF/p75

Des travaux ont montré que le LEDGF/p75 apparaissait clairement comme étant un facteur de croissance et de survie dans certaines conditions de stress, protégeant ainsi les cellules contre la mort induite par le stress. Singh et al. [2] ont rapporté que la surexpression ou l'addition de protéines recombinantes DFS70 stimulait la croissance et améliorait la survie de certaines cultures cellulaires dépourvues de sérum nutritif. Ces effets sont inhibés par l'ajout des anticorps anti-DFS70 dans les cultures. La culture de cellules sous stress oxydatif conduit à des niveaux élevés de LEDGF/p75.

Le LEDGF/p75 apparaît exercer ses fonctions de survie et de protection contre le stress apoptotique en se fixant spécifiquement aux séquences HSE (éléments de réponse aux chocs thermiques) et STRE (éléments de réponse associés au stress), résultant en l'activation de la transcription de protéines antiapoptotiques, incluant les heat shock protein 27, l' α B-crystalline, des hsp90, l'involucrine et la protéine antioxydante 2.

^a Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie
37, rue Romain-Fandel
L-4002 Esch-sur-Alzette – Luxembourg

* Correspondance
sylvie.coito@ketterthill.lu

Le TGF β 1 est un important régulateur de l'apoptose qui influence le contrôle de la prolifération cellulaire et de survie en régulant les gènes centraux de ces processus. Le TGF β 1 réprime l'expression du LEDGF/p75 au niveau de l'ARN et des protéines. Le TGF β 1 exerce ses effets sur le LEDGF/p75 en se liant au TGF β 1 Inhibitory Element (TIE), diminue l'affinité de la liaison avec l'ADN, avec pour conséquence la diminution des Hsp27, l' α B-crystalline, molécules clés dans la survie cellulaire.

Récemment Wu et al. [3] ont démontré que DFS70/LEDGF appartenaient aux autoantigènes nucléaires qui sont clivés pendant les phases précoces de l'apoptose. Ces clivages sont médiés par les caspases 3 et 7 et surviennent après les résidus d'acide aspartique en position 30, 85 et 486. Ces clivages génèrent des fragments de 68 kDa, 65 kDa, et 58 kDa. Ces fragments ont des séquences tronquées dans le domaine N-terminal et ont perdu une partie du domaine C-terminal. Il semblerait que ces domaines jouent un rôle important transcriptionnel de coactivation et de survie de DFS70/LEDGF, et qu'ainsi le clivage du LEDGF/p75 par les caspases 3 et 7 inhibe sa capacité à protéger les cellules. En effet, la surexpression de mutant DFS70/LEDGF tronqué en C- ou N-terminal par des caspases abolit la capacité de ces protéines à protéger la cellule dans un environnement de stress.

4. VIH

Le LEDGF joue de multiples rôles au cours de l'intégration du VIH [4].

Dans le cycle répliatif du VIH-1, le gène du LEDGF est surexprimé et la protéine LEDGF/p75 est un cofacteur de l'intégration du VIH-1, jouant un rôle essentiel dans le phénomène d'intégration stable du virus dans le génome de l'hôte.

Un nombre important d'études a souligné l'importance du LEDGF/p75 dans la réplication du VIH-1 en interagissant avec l'intégrase du VIH par l'intermédiaire de sa région IBD (intégrase-binding domain), retrouvée uniquement dans la région C-terminale de l'isoforme p75 entre les résidus 340 et 417. Des études de mutagenèse ont montré une bonne corrélation entre la perte d'interaction avec le LEDGF/p75 et une diminution de la capacité du virus à se répliquer. La diminution d'affinité pour le LEDGF/p75 va se traduire par un blocage de la réplication au niveau de l'étape d'intégration. Ainsi en interagissant directement avec l'intégrase, le LEDGF/p75 permet le ciblage et l'intégration du virus dans des régions spécifiques du génome humain.

5. Cancers

Récemment, Basu et al. [5] ont montré la présence de ces anticorps dans le sérum de patients atteints de cancer de la prostate (14 %), mais également dans les hyperplasies bénignes de la prostate et dans le tissu environnant la tumeur, siège d'inflammation et de stress oxydatif.

Ces anticorps ont également été décrits associés aux cancers de la thyroïde, du sein et du colon. Ces anticorps sont donc présents dans de nombreuses situations associées à un environnement inflammatoire et de stress oxydatif.

6. Maladies inflammatoires

La première description des anticorps anti-DFS70 par Ochs et al en 1994 [1] concernait un patient atteint de cystite interstitielle, une maladie inflammatoire de la vessie. Puis, en 2000, les mêmes auteurs ont décrit ces anticorps chez des patients atteints de troubles allergiques comme la dermatite atopique: 29,7 % des sérums donnaient l'aspect typique DFS [6], et 72 % de ces patients avaient des anticorps réagissant spécifiquement avec un antigène de 70 kDa par immunoblot. L'analyse des banques de données des séquences de l'ADNc de DFS70 a montré que la protéine DFS70 était identique au coactivateur p75 et au LEDGF/p75. Ces auteurs ont également décrit la présence de ces autoanticorps dans les sérums de patients atteints d'asthme (16 %), du syndrome de Sjögren (6,9 %) mais aussi, avec une moindre prévalence, chez les patients atteints de psoriasis (4,5 %), du syndrome de fatigue chronique (3,3 %) et de sclérodémie (2,5 %). Ayaki et al. [7] ont également montré la grande fréquence des autoanticorps anti-DFS70-LEDGF/p75 chez des patients atteints de dermatite atopique (15 sur 21 : 71,4 %) et chez des patients atteints de dermatite atopique associée à une cataracte (8 sur 8). Yamada et al. [8] ont, quant à eux, démontré la présence de ces anticorps chez des patients atteints de la maladie de Vogt-Koyanagi-Harada (24 sur 36 : 66,7 %), d'ophtalmie sympathique (5 sur 7 : 71,4 %), ou de sarcoïdose (4 sur 16 : 25 %). Cependant, la présence de ces anticorps dans les groupes de sujets sains suggère que la synthèse d'anticorps anti-DFS70 pourrait ne pas être la cause directe de la maladie. Watanabe et al. [9] ont mesuré la prévalence de ces anticorps dans une population saine : 11 % (64 sur 597). Ils ont également relevé une plus forte prévalence chez les sujets d'âge inférieur à 35 ans et chez les femmes. Dellavance et al. [10] ont, eux, analysé par IFI et immunoblot plus de 10 000 sérums contenant des anticorps antinucléaires : ils concluent que les anticorps anti-DFS70 sont fréquents chez les patients ayant des anticorps antinucléaires sans signes de maladies rhumatismales chroniques systémiques, et que, parmi les patients ayant des anticorps anti-DFS70, plus de la moitié ont une thyroïdite auto-immune.

Kang et al. ont, eux, mis en évidence des anticorps anti-DFS70 chez 14,3 % de patients atteints de dermatite séborrhéique, dans 11,1 % des cas d'infection par Herpès simplex, 16,9 % des cas de polyarthrite rhumatoïde, 15,4 % des cas de lupus érythémateux systémique et 14,3 % des cas de syndrome de Sjögren [11]. Plus récemment, Mahler et al. ont, quant à eux, montré une plus grande prévalence des autoanticorps anti-DFS70 chez les sujets sains (8,9 %) et dans 6 % des cas de thyroïdite d'Hashimoto et dans 5 % des cas de cystite interstitielle [12] (*tableau I*).

Toutes ces données suggèrent que les anticorps anti-DFS70 peuvent survenir dans de nombreuses conditions inflammatoires.

Concernant le pronostic des individus ayant des anticorps anti-DFS70, le suivi pendant quatre à cinq ans de quarante sujets sains ayant de tels anticorps a montré l'absence de développement de maladies rhumatismales chroniques systémiques [13]. Ainsi, il a été suggéré que la présence isolée d'un anticorps anti-DFS70 pouvait être pris comme un élément allant à l'encontre du diagnostic de maladies

Tableau I – Prévalence des anticorps anti-DFS70.

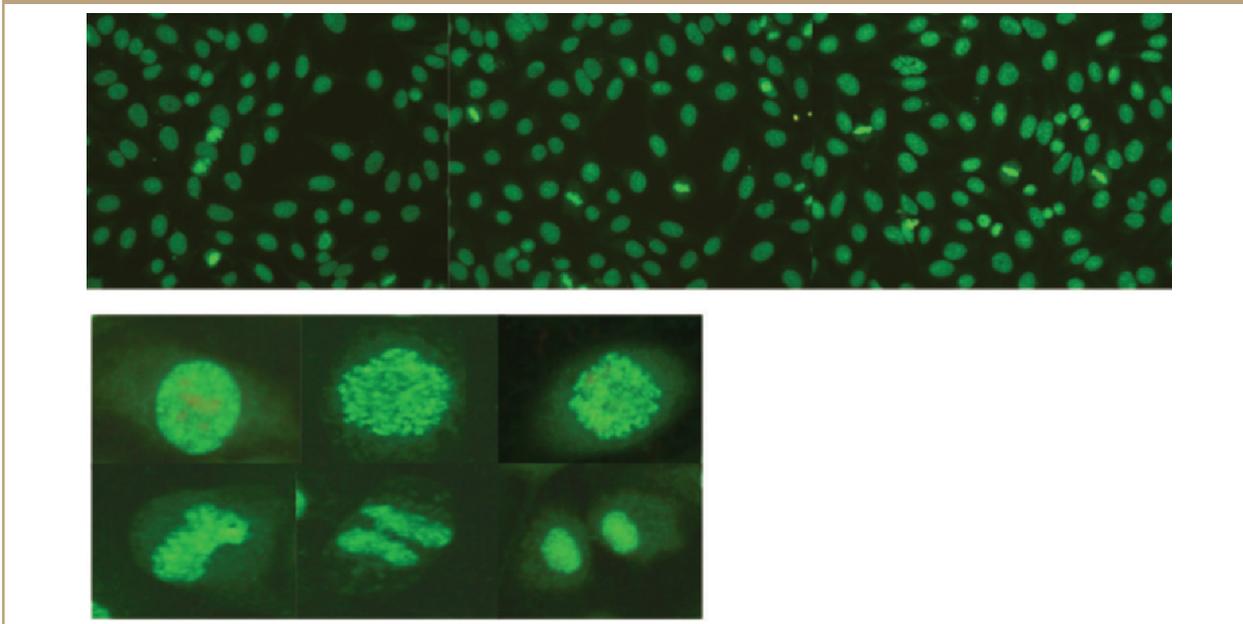
Diagnostic clinique	Référence	Nombre de patients	Nombre de profils DFS70 (%)
Alopecia areata	Kang et al., 2009 [11]	124	4 (3,2)
Alopécie androgénique	Kang et al., 2009 [11]	367	5 (1,4)
Asthme	Ochs et al., 2000 [6]	50	8 (16,0)
	Mahler et al., 2012 [12]	25	1 (4)
Cancer	Mahler et al., 2012 [12]	40	0 (0)
Cystite Intertitielle	Ochs et al., 2000 [6]	103	9 (8,7)
	Mahler et al., 2012 [12]	40	2 (5,0)
Dermatite allergique de contact	Kang et al., 2009 [11]	101	8 (7,9)
Dermatite atopique	Ochs et al., 2000 [6]	64	19 (29,7)
	Ayaki et al., 2002 [7]	21	15 (71,4)
	Mahler et al., 2012 [12]	16	0 (0)
	Kang et al., 2009 [11]	74	5 (6,8)
Dermatite atopique-cataracte	Ayaki et al., 2002 [7]	8	8 (100)
Dermatite Séborrhéique	Kang et al., 2009 [11]	14	2 (14,3)
Herpes zoster	Kang et al., 2009 [11]	54	6 (11,1)
Infections	Mahler et al., 2012 [12]	20	0 (0)
Lupus érythémateux systémique	Ochs et al., 2000 [6]	36	0 (0)
	Watanabe et al., 2004 [9]	55	1 (1,8)
	Mahler et al., 2012 [12]	251	(2,8)
	Kang et al., 2009 [11]	13	2 (15,4)
Maladie de Behçet	Kang et al., 2009 [11]	7	0 (0)
Maladie de Graves	Mahler et al., 2012 [12]	60	(1,7)
MICI	Mahler et al., 2012 [12]	34	0 (0)
Ophthalmie sympathique	Yamada et al., 2001 [8]	7	5 (71,4)
Phénomène de Raynaud	Kang et al., 2009 [11]	4	0 (0)
Polyarthrite rhumatoïde	Ochs et al., 2000 [6]	30	0 (0)
	Watanabe et al., 2004 [9]	40	0 (0)
	Mahler et al., 2012 [12]	39	(2,6)
	Kang et al., 2009 [11]	65	11 (16,9)
Polymyosite/Dermatomyosite	Watanabe et al., 2004 [9]	25	0 (0)
	Muro et al., 2013 [14]	116	7 (6,4)
Psoriasis	Ochs et al., 2000 [6]	22	1 (4,5)
Sarcoïdose	Yamada et al., 2001 [8]	16	4 (25,0)
Sclérodémie	Ochs et al., 2000 [6]	40	1 (2,5)
	Watanabe et al., 2004 [9]	50	0 (0)
	Mahler et al., 2012 [12]	29	0 (0)
	Kang et al., 2009 [11]	2	0 (0)
Sclérose en plaque	Mahler et al., 2012 [12]	10	0 (0)
Spondylarthrite ankylosante	Kang et al., 2009 [11]	87	4 (4,6)
Syndrome de fatigue chronique	Ochs et al., 2000 [6]	60	2 (3,3)
Syndrome de Sjögren	Ochs et al., 2000 [6]	29	2 (6,9)
	Watanabe et al., 2004 [9]	30	2 (6,7)
	Mahler et al., 2012 [12]	7	0 (0)
	Kang et al., 2009 [11]	7	1 (14,3)
Syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada	Yamada et al., 2001 [8]	36	24 (66,7)
Thyroïdite de Hashimoto	Mahler et al., 2012 [12]	67	4 (6,0)
Urticaire	Kang et V 2009 [11]	113	1 (0,9)
Autres pathologies	Mahler et al., 2012 [12]	53	0 (0)
Contrôles sains	Ochs et al., 2000 [6]	39	0 (0)
	Yamada et al., 2001 [8]	37	8 (21,6)
	Watanabe et al., 2004 [9]	597	64 (10,7)
	Mahler et al., 2012 [12]	124	11 (8,9)
Donneurs de sang	Ayaki et al., 2002 [7]	650	35 (5,4)

rhumatismales chroniques systémiques comme le lupus érythémateux systémique [9, 13-15]. Des propositions d'algorithme décisionnel ont même été faites [16].

Les autoanticorps antinucléaires sont généralement présents chez les patients souffrant de maladies rhumatismales chroniques systémiques et sont inclus dans les critères de classification du lupus érythémateux systémique.

La non-reconnaissance des anticorps anti-DFS70 lors du dépistage des anticorps antinucléaires sur cellules HEP-2, sans preuve évidente de maladies rhumatismales chroniques systémiques, peut conduire à de nouvelles consultations médicales, à de l'anxiété et chez les patients et chez les médecins, et peut conduire également à des thérapeutiques inappropriées et potentiellement toxiques.

Figure 2 – Aspect en immunofluorescence indirecte des anticorps anti-DFS70.



7. Techniques de détection et d'identification

Les anticorps anti-DFS70 se détectent en IFI sur cellules HEP-2. Typiquement, on observe un marquage granulaire dense des noyaux en interphase et des chromosomes condensés en mitose (*figure 2*). Cependant, selon le fournisseur de lames, ces aspects typiques ne sont pas toujours très faciles à reconnaître [17].

La nature des anticorps anti-DFS70 peut être confirmée soit par dot, soit en ELISA. Grâce à l'obtention des protéines recombinantes, on a pu développer des méthodes spécifiques pour l'identification des anticorps anti-DFS70. Une protéine correspondant aux résidus 338 à 530 est utilisée dans un kit ELISA développé au Japon par la firme MBL. Aux USA, la firme INOVA utilise une protéine correspondant aux séquences d'acides aminés 349 à 435 fixée sur des microparticules dans une technique de chimiluminescence (QUANTA Flash DFS70).

Figure 3 – Dots DFS70 positifs.



La même protéine est également utilisée dans un immunodot développé en Belgique par la firme D-Tek (ALPHADIA) (figure 3). Les résultats obtenus au Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie par les techniques de confirmation par dot et par ELISA sont bien corrélés (figure 4). D'autres firmes, telle qu'apDia, commencent également à commercialiser des dots comprenant l'antigène.

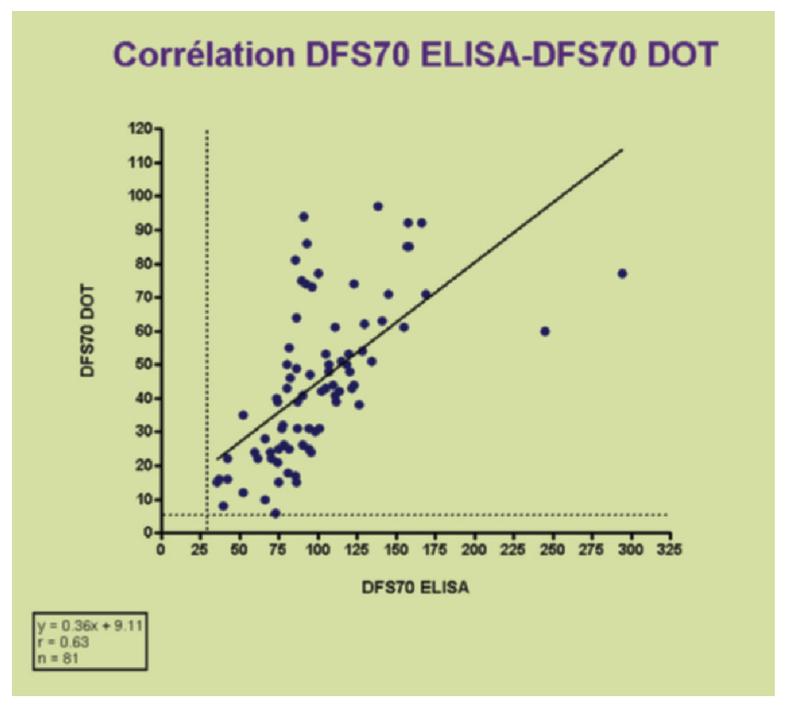
8. Conclusion

Ce type d'anticorps, jusque-là non associé à une pathologie de façon spécifique, est mal connu et est source de confusion pour les médecins et les patients, voire les biologistes. En effet, la découverte d'un autoanticorps est généralement associée à une pathologie, et donc la méconnaissance des associations cliniques des anticorps anti-DFS70 peut conduire à des investigations médicales plus avancées et à de l'inquiétude sur la signification de ces anticorps. De là, est-il justifié de ne pas les rendre ? Etant donné que la présence d'anticorps précède généralement l'apparition de signes cliniques, il semble nécessaire de les citer dans les comptes rendus. Cependant, vu le recul, et l'absence d'association avec une pathologie particulière, il convient de ne pas inquiéter

les cliniciens et de préciser dans un commentaire la signification de la présence de ces anticorps anti-DFS70.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Figure 4 – Corrélation entre techniques de confirmation des anticorps anti-DFS70.



Références

- [1] Ochs RL, Stein TW Jr, Peebles CL, et al. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol* 1994;151(3):587-92.
- [2] Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, et al. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:373-81.
- [3] Wu X, Daniels T, Molinaro C, et al. Caspase cleavage of the nuclear autoantigen LEDGF/p75 abrogates its pro-survival function: implications for autoimmunity in atopic disorders. *Cell Death Differ* 2002;9(9):915-25.
- [4] Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, et al. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 2003;278(35):33528-39.
- [5] Basu A, Rojas H, Banerjee H, et al. Expression of the stress response oncoprotein LEDGF/p75 in human cancer: a study of 21 tumor types. *PLoS One* 2012;7(1):e30132.
- [6] Ochs RL, Muro Y, Si Y, et al. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(6 Pt1):1211-20.
- [7] Ayaki M, Ohguro N, Azuma N, et al. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity* 2002;35(5):319-27.
- [8] Yamada K, Senju S, Shinohara T, et al. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol Lett* 2001;78(3):161-8.
- [9] Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum* 2004;50(3):892-900.
- [10] Dellavance A, Viana VS, Leon EP, et al. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J Rheumatol* 2005;32(11):2144-9.
- [11] Kang SY, Lee WI. Clinical significance of dense fine speckled pattern in anti-nuclear antibody test using indirect immunofluorescence method. *Korean J Lab Med* 2009;29(2):145-51.
- [12] Mahler M, Parker T, Peebles CL, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2012;39(11):2104-10.
- [13] Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63(1):191-200.
- [14] Muro Y, Sugiura K, Nakashima R, et al. Low prevalence of anti-DFS70/LEDGF antibodies in patients with dermatomyositis and other systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2013;40(1):92-3.
- [15] Miyara M, Albesa R, Charuel JL, et al. Clinical phenotypes of patients with anti-DFS70/LEDGF antibodies in a routine ANA referral cohort. *Clin Dev Immunol* 2013;art ID 703759.
- [16] Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2012;art ID 494356.
- [17] Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D. Recognizing the dense fine speckled/lens epithelium-derived growth factor/p75 pattern on HEp-2 cells: not an easy task! Comment on the article by Mariz et al. *Arthritis Rheum* 2011;63(12):4036-7.