



ELSEVIER

Journal of Autoimmunity

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jautimm](http://www.elsevier.com/locate/jautimm)



## Novel autoantibodies to the $\beta$ -cell surface epitopes of ZnT8 in patients progressing to type-1 diabetes

Yong Gu<sup>a,1</sup>, Chengfeng Merriman<sup>c,1</sup>, Zheng Guo<sup>c</sup>, Xiaofan Jia<sup>a</sup>, Janet Wenzlau<sup>a</sup>, Hua Li<sup>b</sup>,  
Huilin Li<sup>b</sup>, Marian Rewers<sup>a</sup>, Liping Yu<sup>a,\*\*</sup>, Dax Fu<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Barbara Davis Center for Diabetes University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO, USA

<sup>b</sup> Department of Structural Biology, Van Andel Institute, Grand Rapids, MI, USA

<sup>c</sup> Department of Physiology, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Margot Lepage, David Goncalves, Nicole Fabien

## Intérêt diagnostique des anticorps anti-ZnT8

**\*60-80 % des patients DID type 1**

**\* 86-94 % : + 2 autres anticorps « classiques »: anti-GAD,IA2,insuline**

**\* 98 %: 4 anticorps positifs**

**\* 26% des sujets jeunes sans ICA ni ac anti-GAD, anti-IA-2, anti-insuline**

**\*Détectés à partir de l'âge de 2 ans**

\*Taux des ac anti-ZNT8 : peut augmenter jusqu'à la date du diagnostic

peut diminuer rapidement dans les mois suivants le diagnostic

**The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes Wenzlau et al. PNAS 2007;104:17040-5**

**Cible des autoanticorps anti-ZnT8 = Zinc Transporter-8**

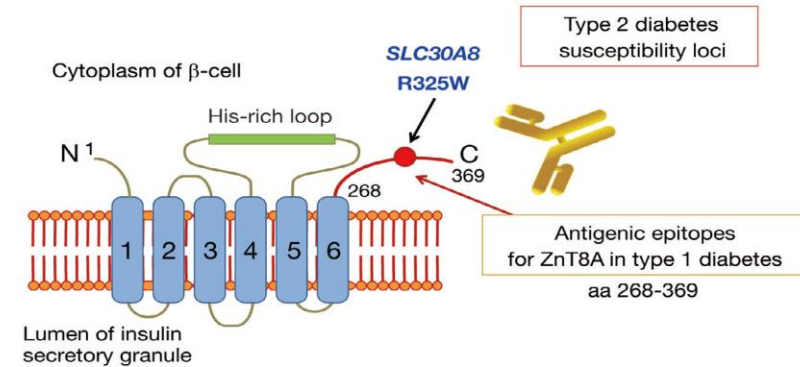
## Protéines transporteurs des cations

6 domaines transmembranaires, 496 AA, 54 kDa

Gène **SLC30A8** Polymorphisme codon /AA 325

+s isoformes de protéines/3 variants : **Arginine (R) 325, Tryptophane (W) 325 and Glutamine(Q) 325** Kawasaki, Endocrine Journal 2012, 59, 531-537

Andersen et al. Pediatr Diabets 2012 13 :454-62



**Expression forte : membrane des granules de sécrétion contenant l'insuline dans les cellules  $\beta$**

Expression faible: lymphocytes, tissu adipeux sous cutané, cellules pancréatiques  $\alpha$

**Rôle: Prise en charge intravésiculaire du zinc**

**Rôle du zinc: synthèse, stockage et sécrétion d'insuline**

→ cristallisation, stabilité de l'insuline sous forme d'hexamères : 6 molécules fixées au milieu par une molécule de Zinc

\* **Diminution d'expression de ZnT8 :**

diminution de la capture du zinc exogène, réduction du stock cellulaire d'insuline,  
diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à un stimulus hyperglycémique

Down regulation of ZnT8 expression in INS-1 rat pancreatic beta cells reduces insulin content and glucose-inducible insulin secretion Fu Y et al, PLoS One, 2009; 25 ;4

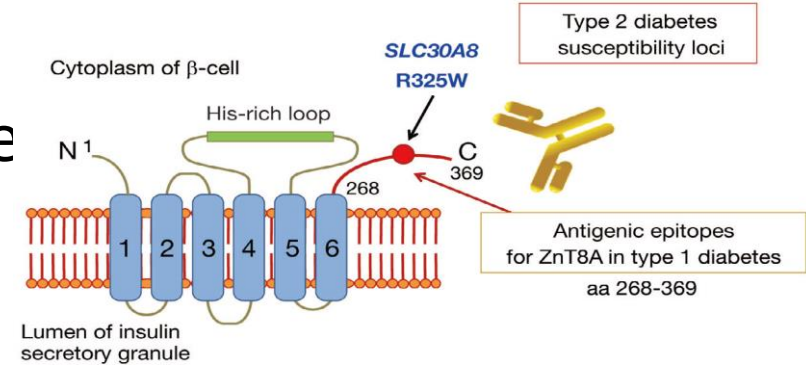
\*Effet anti-oxydant et anti-apoptotique: rôle protecteur sur le pancréas

# Epitopes majeurs des autoanticorps anti-ZnT8

\* **Domaine transmembranaire (TDM)** majoritaire

\* Partie cytosolique intracellulaire:

**domaine C-terminal (CTD)** et **N-terminal (NTD)**



**Anti-ZnT8 recherchés actuellement : épitopes intracellulaires de CTD**

variants Arginine (R) 325 et Tryptophane (W) 325 / rares variants Glutamine (Q) 325 ou autres variants

**NTD** : antigène mineur : 8% anti-ZnT8 et croise à 99% avec CTD

**TDM** deux fois plus grand que **CTD**

→ Antigénicité des épitopes extracellulaires ?

## Techniques de dosage

**\*Technique de radio-immunoprécipitation**

**\*Technique immunoenzymatique de type ELISA**

**Partie C-terminale de ZnT8 des variants R325 et W325**

**Performances similaires de sensibilité et de spécificité de la technique ELISA vs radio-immunologique (programme IASP 2012« Islet Autoantibody Standardization Program »)**

**\*Technique immunoenzymatique de type ELISA**

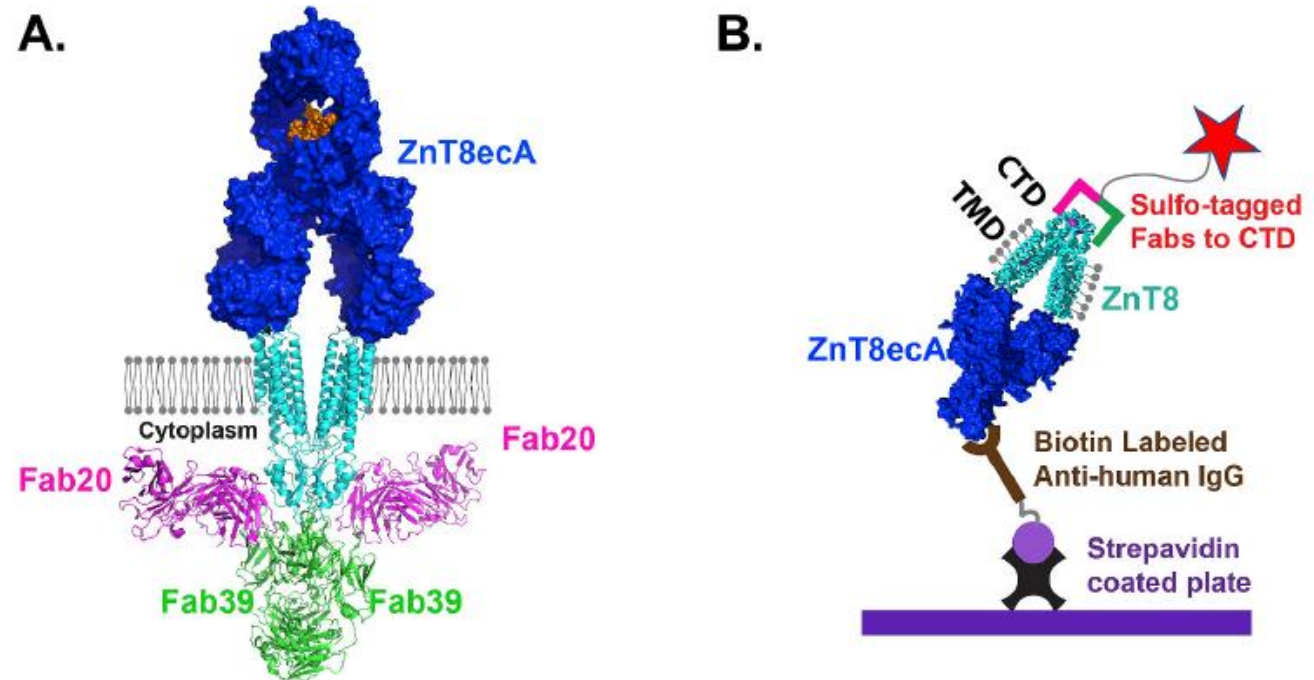
**Protéine chimérique IA2-ZnT8WR (2 polymorphismes principaux de ZnT8)**

# Mise au point test de détection des ac anti-ZnT8 extracellulaires (ZnT8ec)

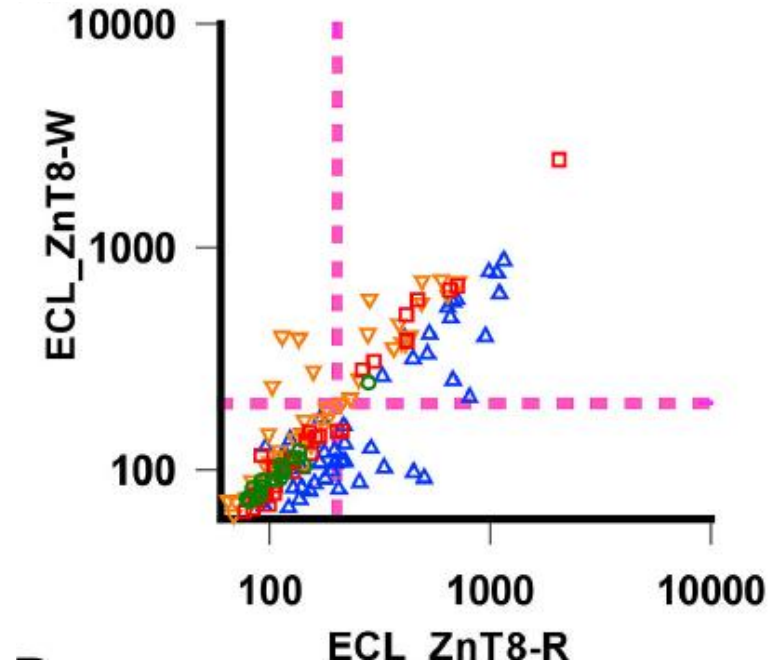
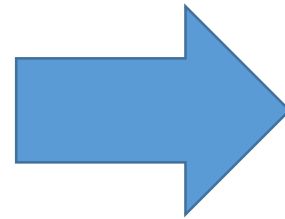
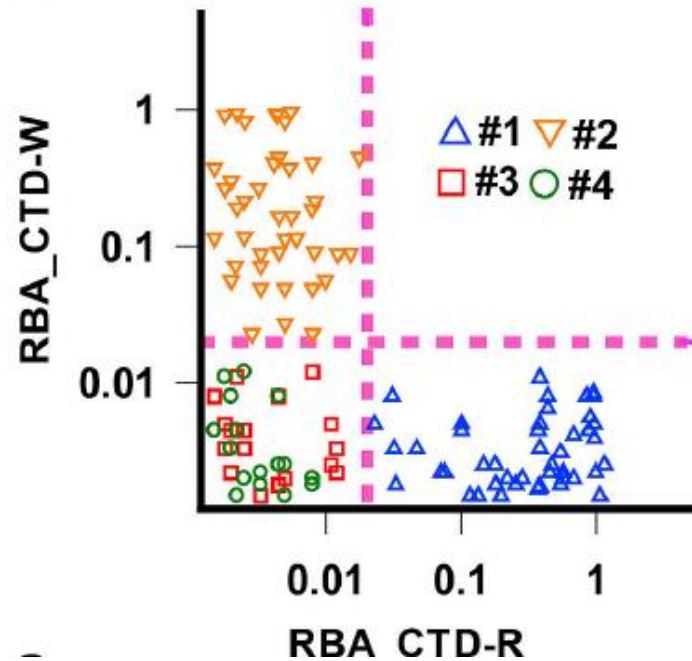
- Production de protéine ZnT8 native associée à un complexe de stabilisation
- Complexe de stabilisation avec fragments Fab de 2 anticorps monoclonaux anti-ZnT8ic.
- ZnT8 tronqué avec NTD de 13 AA seulement.

→ Conservation des épitopes conformationnels  
→ Blocage fixation des anti-ZnT8 intracellulaires

Test par électrochimiluminescence (ECL)



# Détection des anti-ZnT8ec



Sélection de sérums ne montrant pas de réactivité croisée des anti-ZnT8ic (patients homozygotes pour un isoforme de ZnT8)

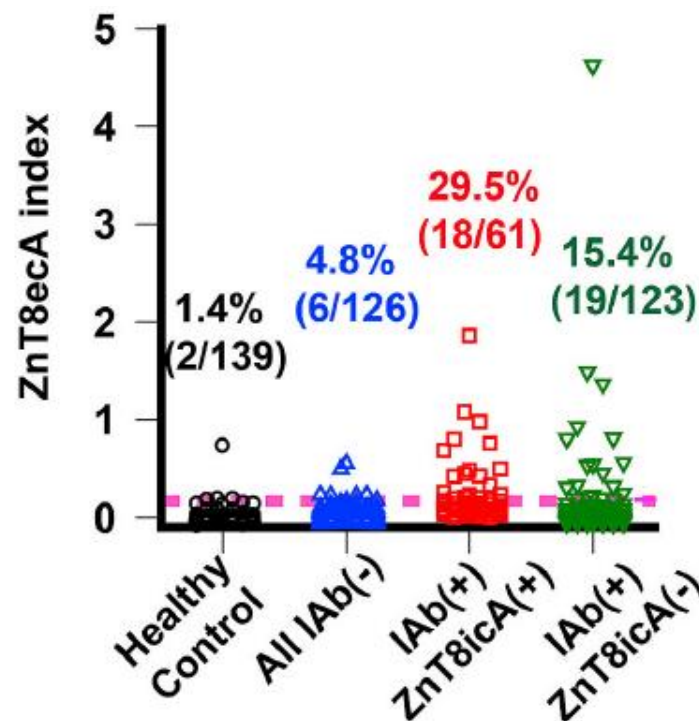
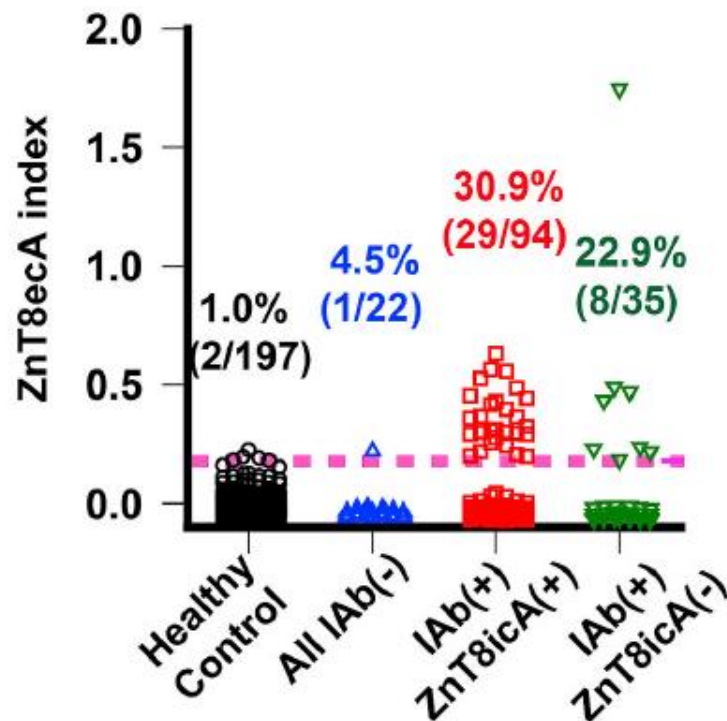
**Réactivité croisée des anti-ZnT8ec pour les deux isoformes de ZnT8**

Exclusion des sérums de réactivité croisée / 2 isoformes de l'épitope intracellulaire

# Validation du test : 2 cohortes DID/contrôles sains

Taux de positivité des anti-ZnT8ec significativement supérieur chez les enfants. Auto-immunité plus agressive chez les enfants.

	Group 1			Group 2		
	T1DM <sup>a</sup>	IAb- DM	Control	T1DM <sup>b</sup>	IAb- DM	Control
n =	129	22	197	184	126	139
Age (yr): mean	12.2	12.8	13.4	13.8	15.7	17.1
median	11.6	13.2	11.5	11.4	13.2	11.7
range	2.0–45.8	1.3–34.8	0.7–51.6	0.7–67.6	1.3–66.8	2.0–51.0
Female (%)	57.4%	50.0%	50.8%	52.6%	45.8%	48.2%



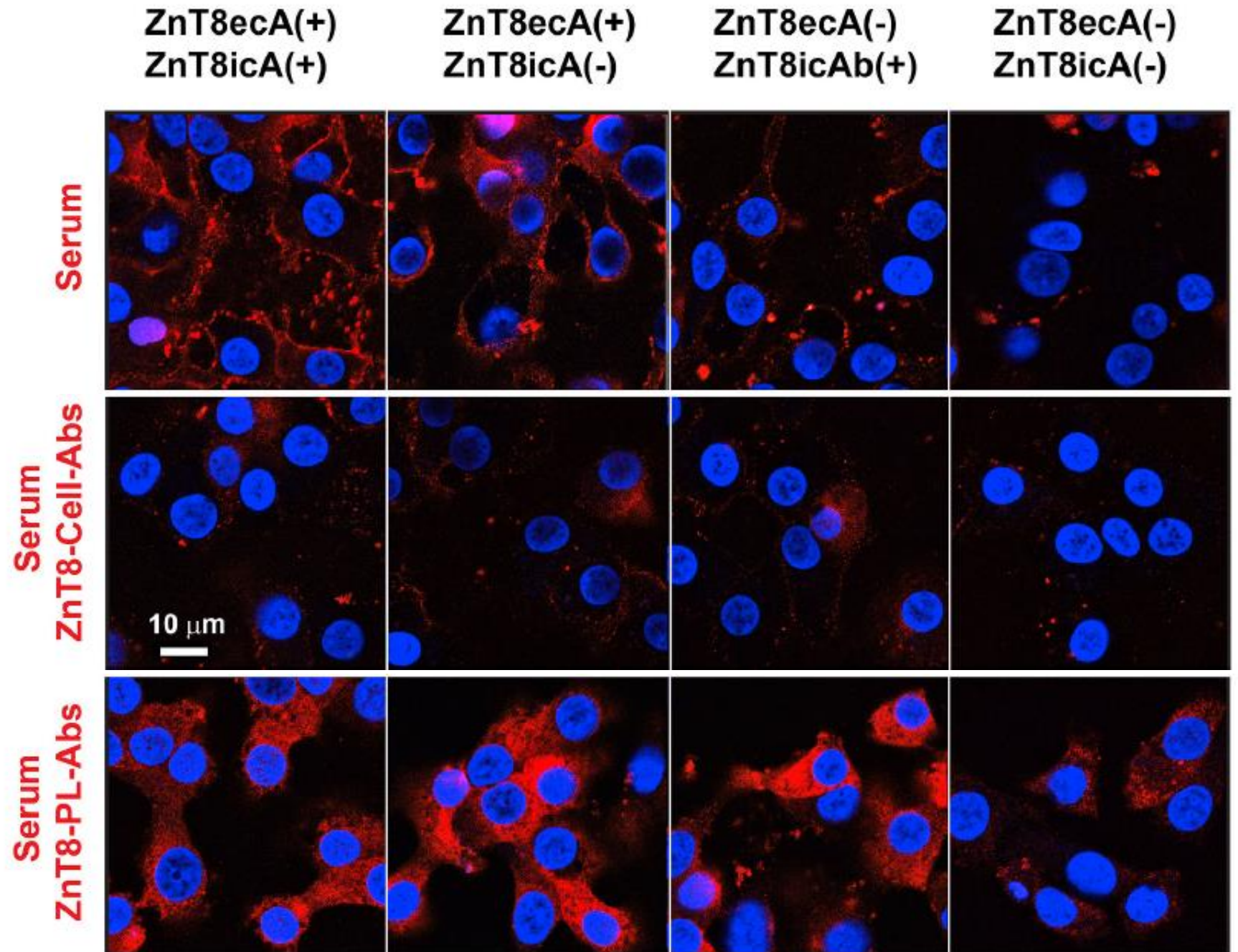
- Sensibilité : **23,6%**
- spécificité de **99 % / 336** sujets sains
- Indépendance anti-ZnT8ec et anti-ZnT8ic



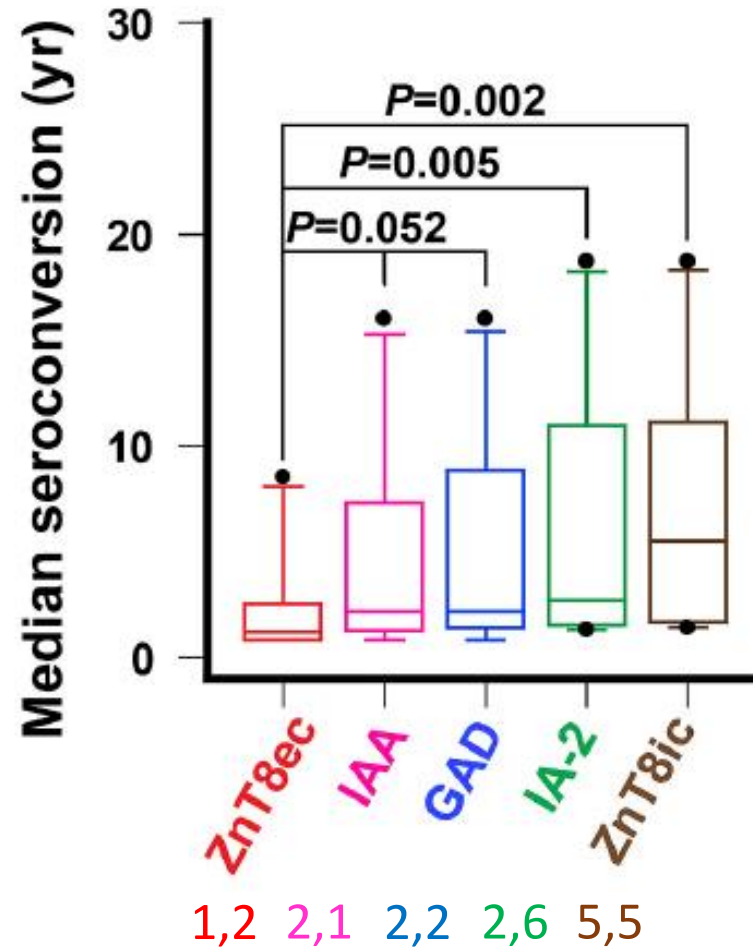
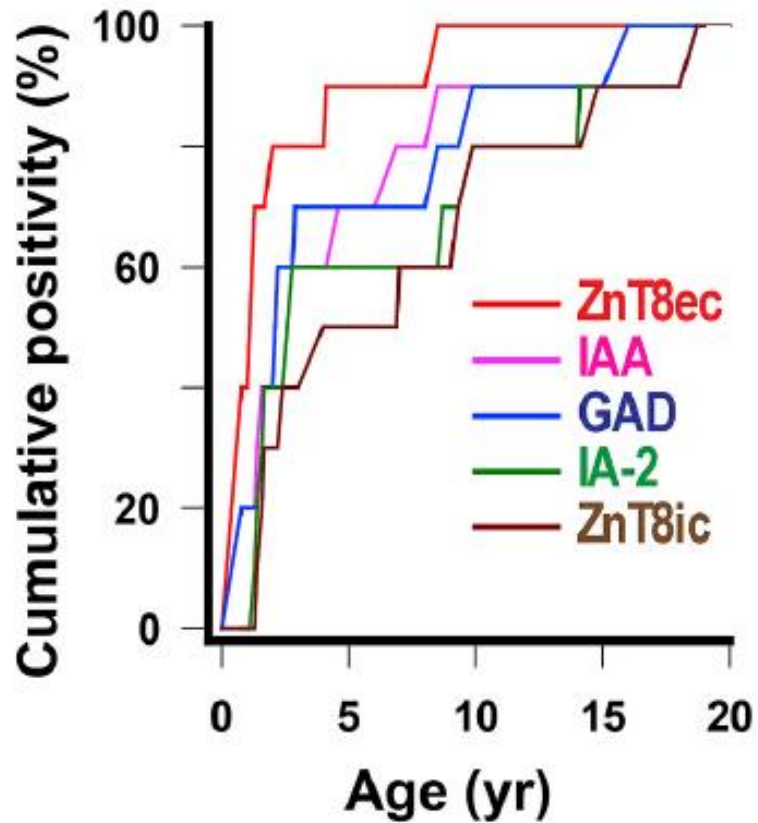
# Confirmation par IFI sur cellules $\beta$

Pré-absorption par ZnT8-  
GFP surexprimé à la surface  
de cellules de rats

Pré-absorption par ZnT8  
humain purifié dans des  
protéo-liposomes



# Suivi longitudinal de 30 enfants de la naissance à DT1



- 10/30 anti-ZnT8ec +
- 7/10 premiers Acs
- 3/10 en même temps anti-insuline et/ou anti-GAD

# Limites de l'article

- Cohortes : 0.7 à 66.8 ans **sans analyse par classe d'âge**  
prévalence des autres auto-anticorps variable selon l'âge
- 2 Cohortes de diabètes : **DT1 + , Diabète avec ac : DT2 insulino-dépendants, LADA ?**
- IFI sur lignée cellulaire mais **absence d'IFI sur tissu pancréatique**
- Application en routine difficile du fait de la **complexité du test ECL**

## Discussion/Conclusion ac Anti-ZnT8<sup>ec</sup>

- **nouveaux biomarqueurs ? : test ELISA plus simple commercialisé**

- \* **Valeur prédictive**

- \* **Valeur pronostique :**

séroconversion précoce associée à risque élevé de progression vers un diabète clinique

- **Rôle dans le déclenchement du mécanisme auto-immun /**

cellules bêta des îlots

Positivité précoce et fixation à la membrane cellulaire

→ **Effet cytotoxique** via ADCC, CDC ou autre ?

→ **Stress cellulaire et destruction cellules bêta?**

# Quelques images en IFI

## ICA

- \*ac anti-GAD isolés
- \*ac anti-IA2 isolés
- \*ac anti-ZnT8 isolés

ICA / PANCREAS DE PRIMATE werfen  
anti-GAD, IA2, ZnT8 : ELISA MEDIPAN

Numéros	GAD seuil à 5	IA2 seuil à 10	ZNT8 seuil à 15	IFI ICA seuil à 10	
0210624526	<2	> 200	> 500	> 40	Photo 1: GAD -/IA2 + / ZnT8 +
0210910634	<2	> 200	426	> 40	
0182214743	> 250	196	<2	> 40	Photo 8:GAD +/IA2 + / ZnT8 -
0210934776	> 250	<2	<2	<10	
0210872713	> 250	<2	<2	<10	
0210910381	> 250	<2	<2	<10	
0210936324	> 250	<2	<2	<10	
1210120822	> 250	<2	<2	40	
0210989402	> 250	<2	<2	10	
0211023998	<2	<2	160	<10	
0211036083	<2	> 200	> 42	<10	
1210141210	71	<2	<2	20	
0211098035	<2	96	> 500	20	Photo 5: GAD -/IA2 + / ZnT8 +
0211142426	<2	16	<2	<10	Photo 4: GAD -/ IA2 +/ZnT8-
0211154930	> 250	> 200	<2	40	Photo 6: GAD +/IA2 + / ZnT8 -
0211053852	126	<2	<2	<10	
0211371187	233	<2	<2	<10	Photo 3: GAD +/ IA2 -/ZnT8-
0211404578	8	<2	> 500	40	
0211420864	2,2	84	<2	40	Photo 7: GAD - /IA2 + /ZnT8 -
0211322618	90	2	<2	<10	
0211344673	>250	<2	<2	40	Photo 2: GAD +/ IA2 -/ZnT8-
0211467731	97	<2	<2	<10	

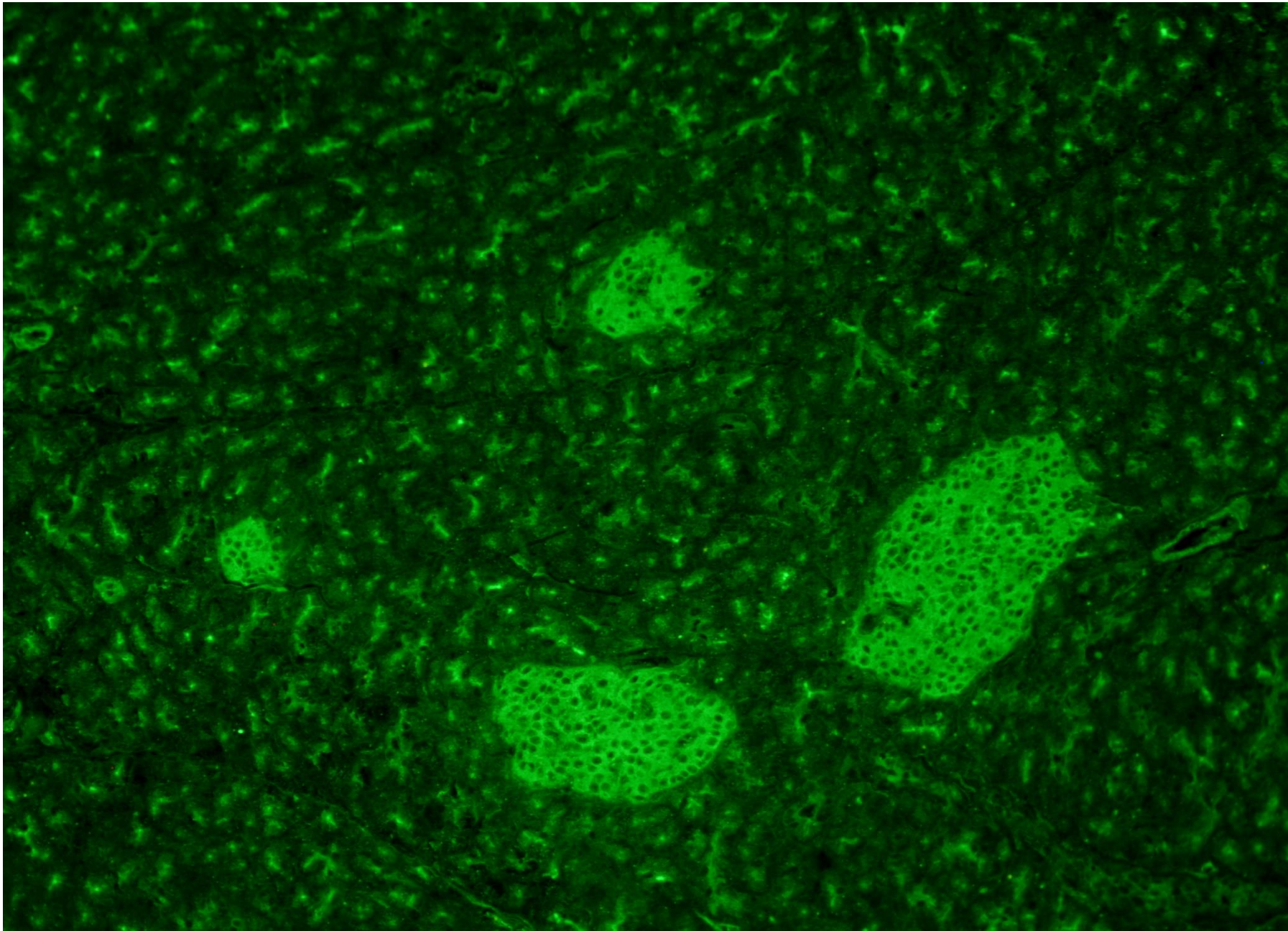


Photo 1: GAD -/IA2 + >200 / ZnT8 + >500

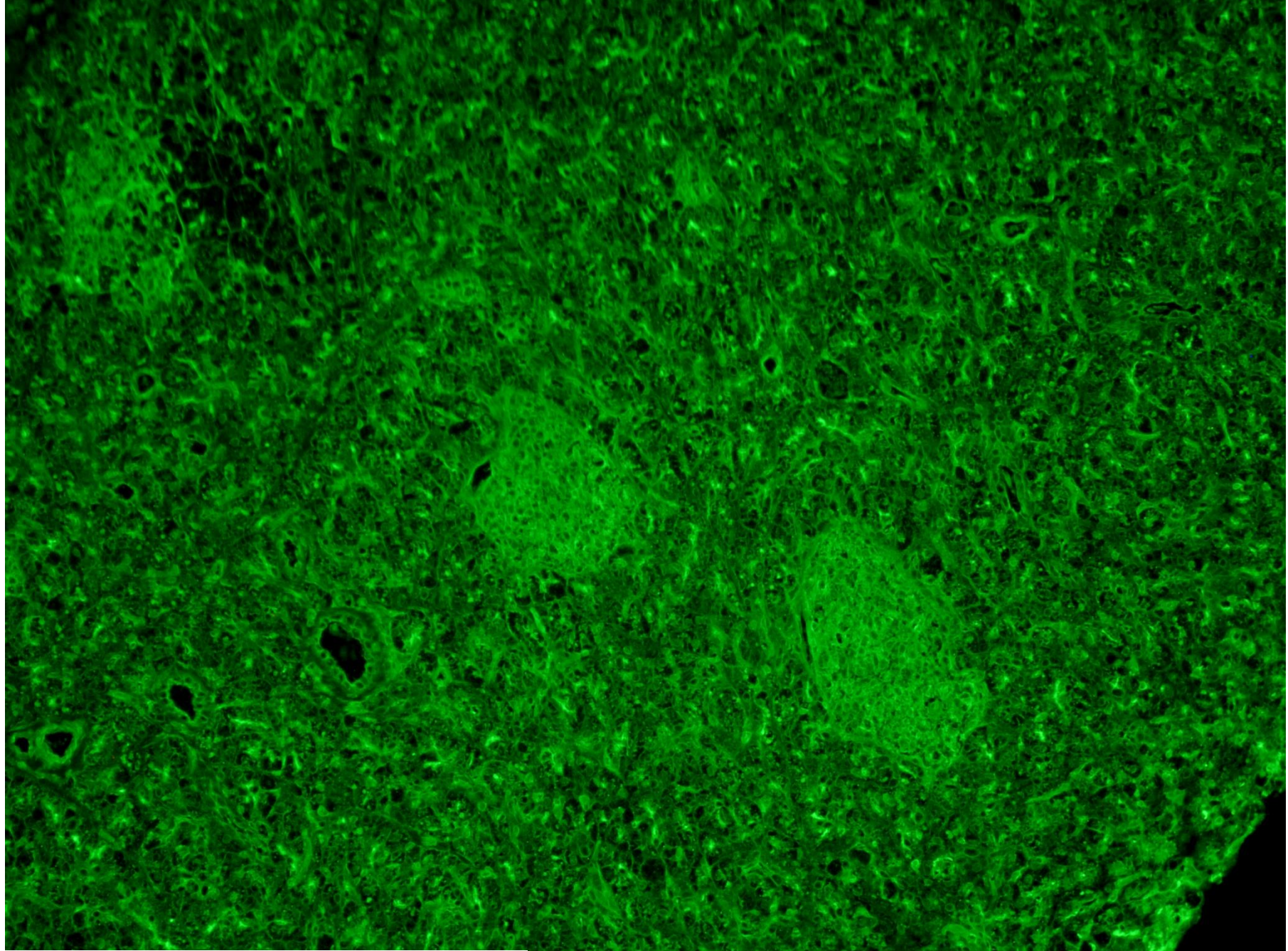


Photo 2: GAD + > 250 / IA2 -/ZnT8-



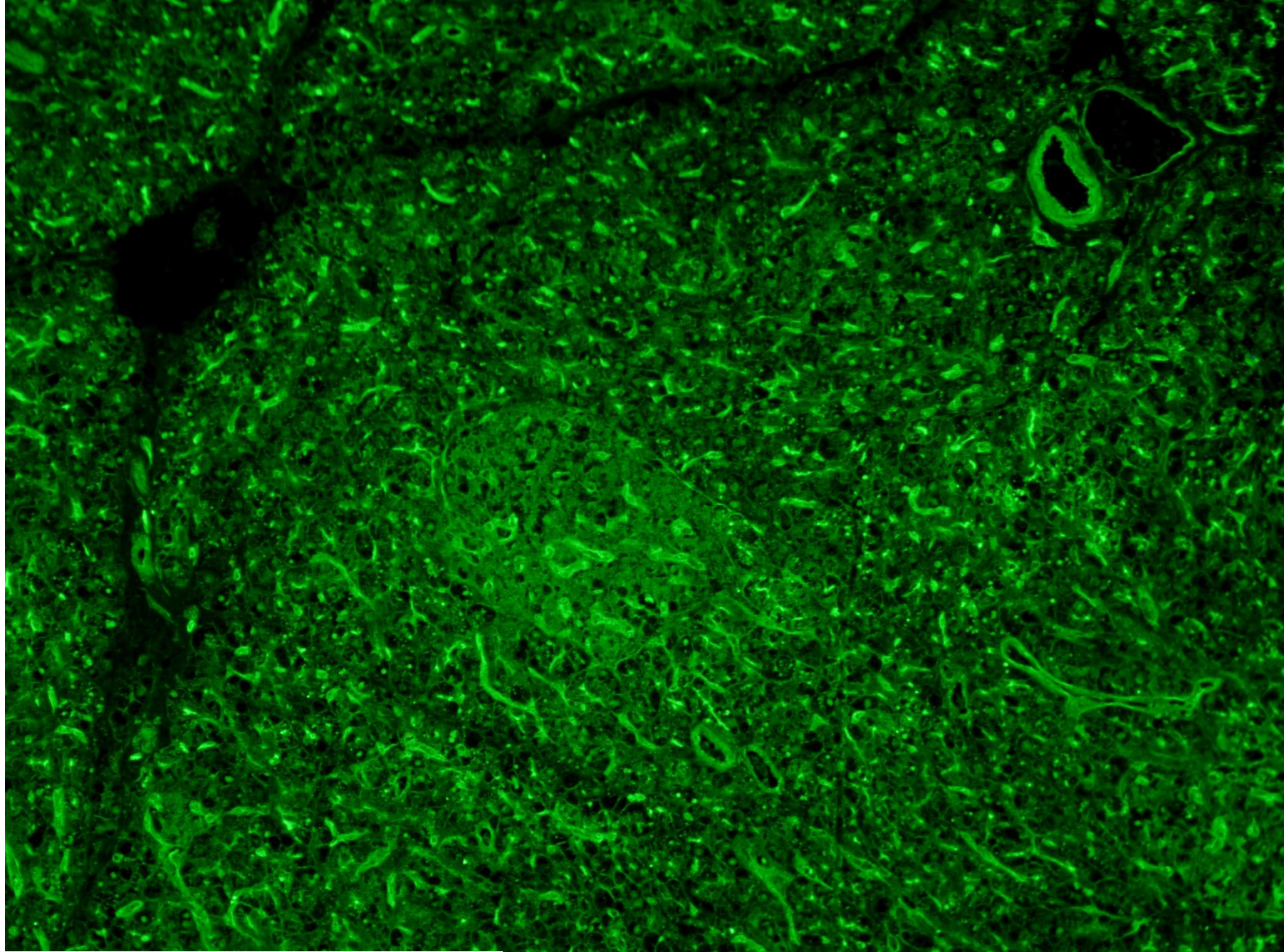


Photo 3: GAD + 233 / IA2 - / ZnT8 -

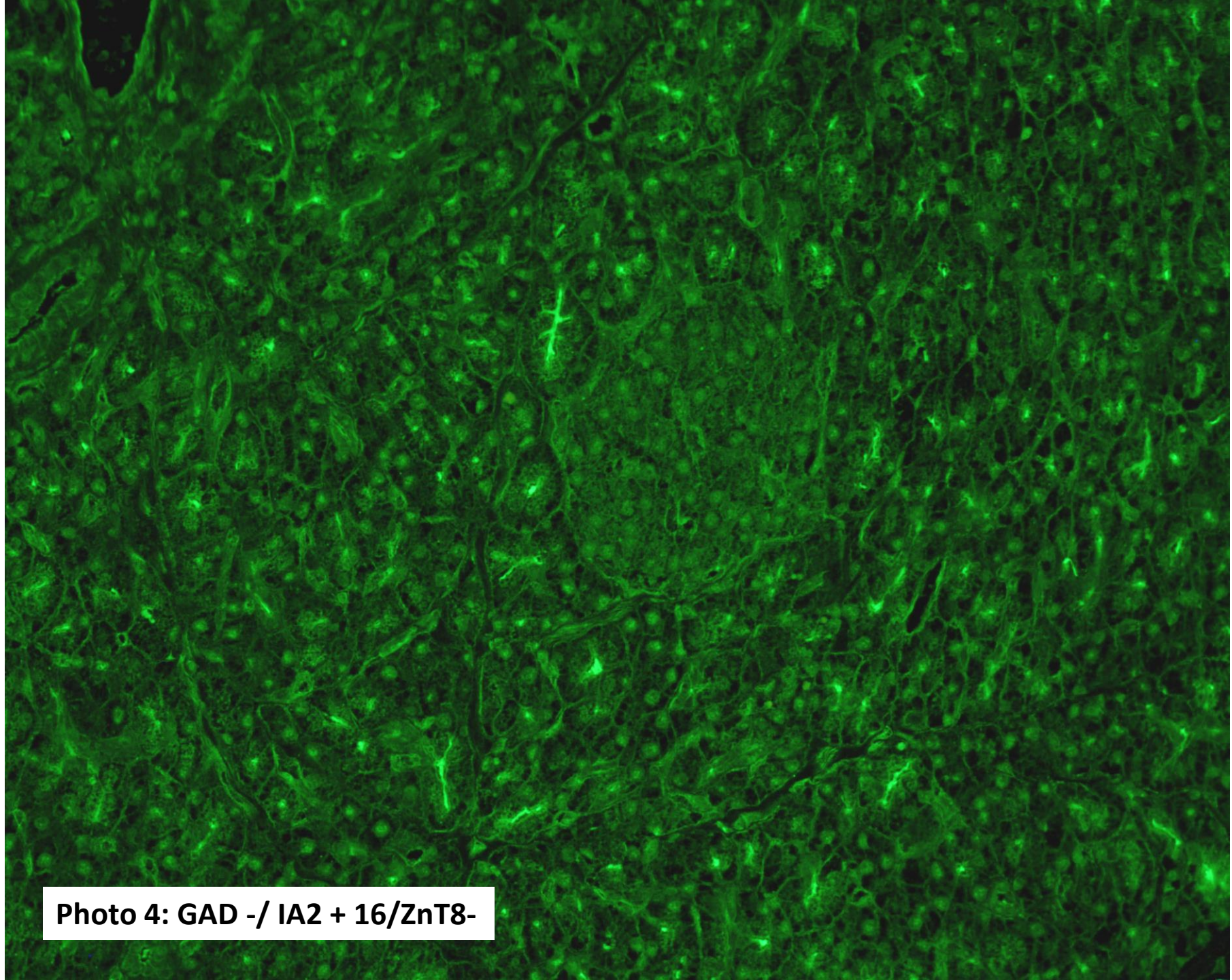


Photo 4: GAD -/ IA2 + 16/ZnT8-

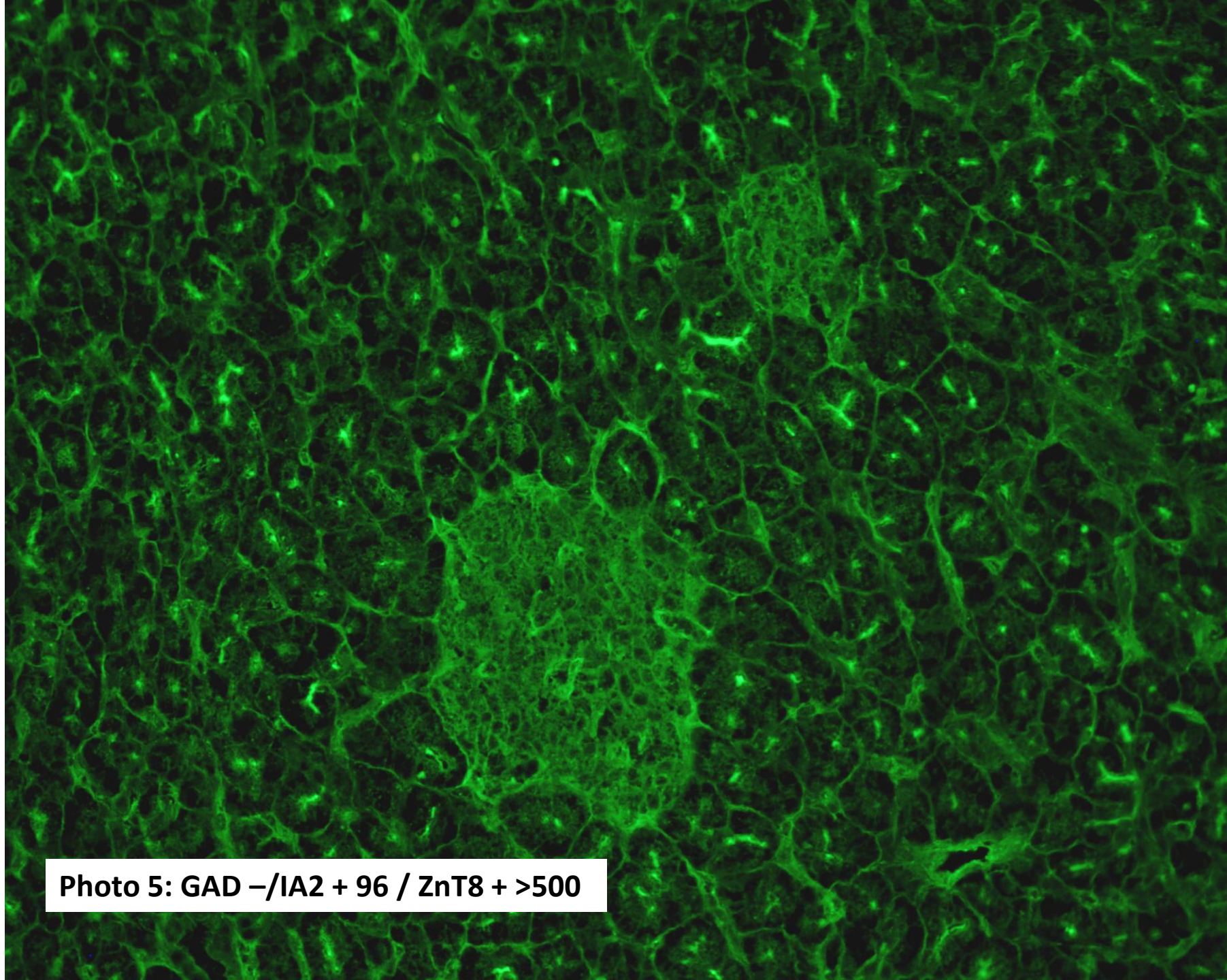


Photo 5: GAD -/IA2 + 96 / ZnT8 + >500

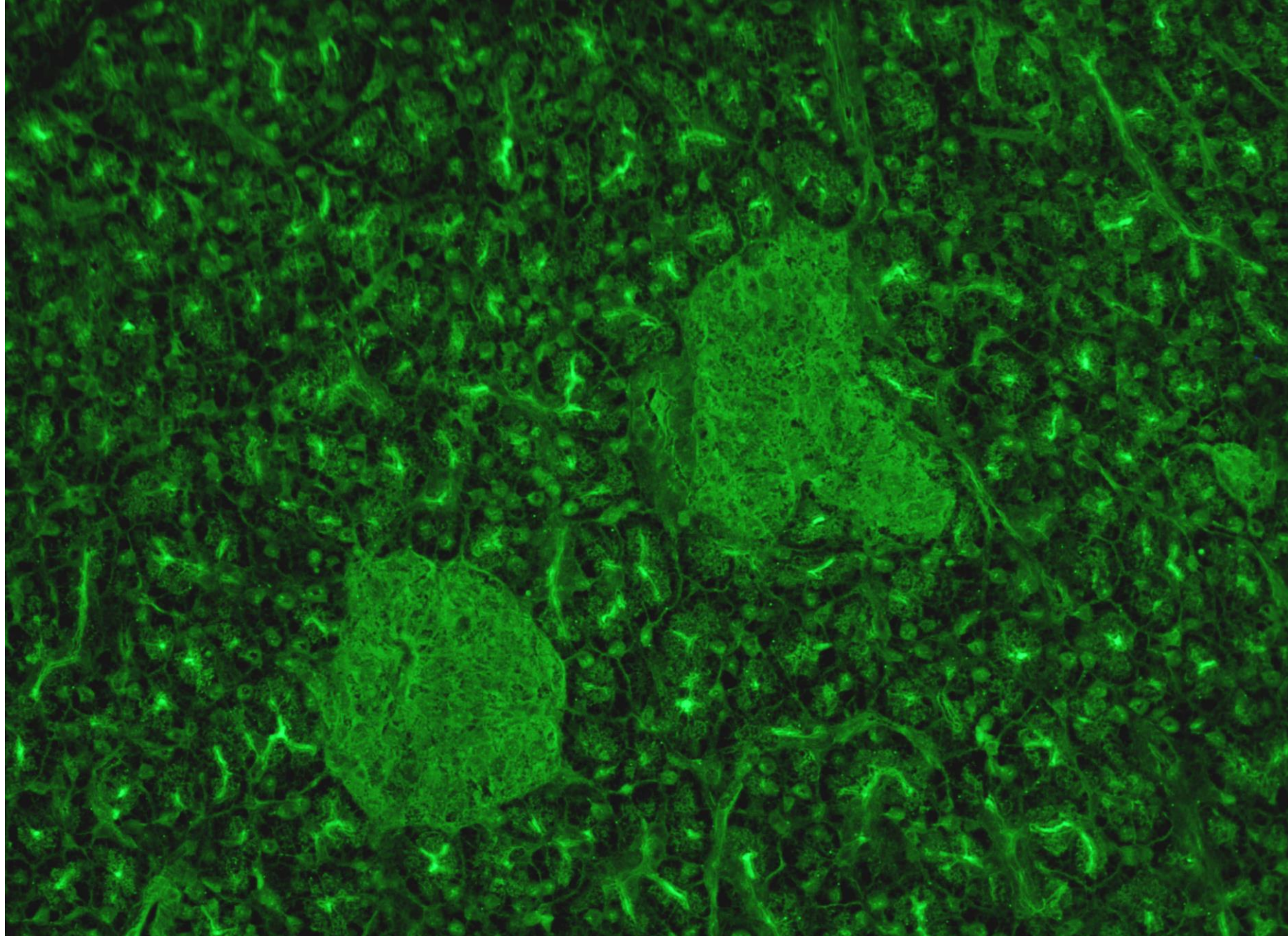


Photo 6: GAD + > 250 / IA2 + > 200/ ZnT8 -

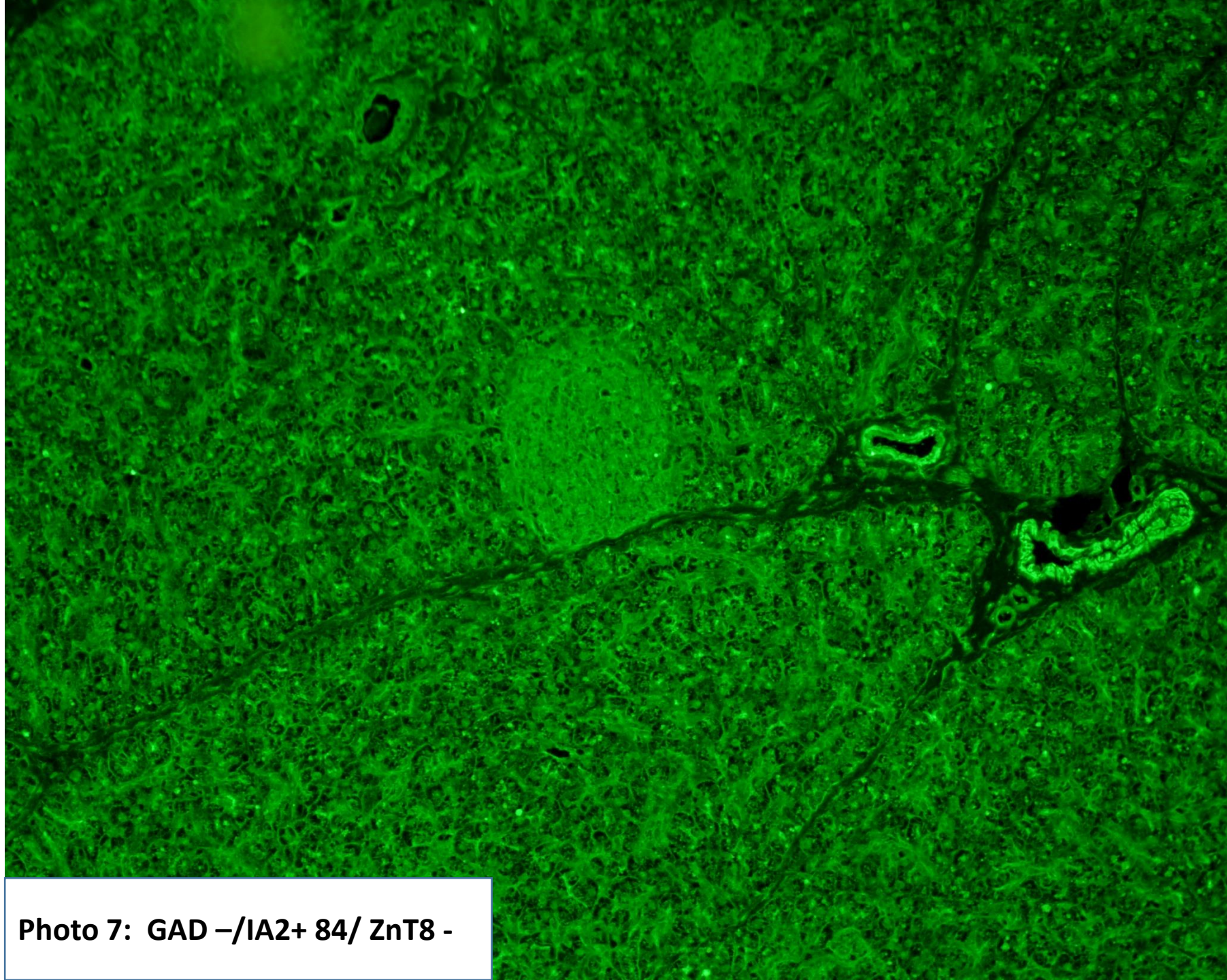


Photo 7: GAD -/IA2+ 84/ ZnT8 -

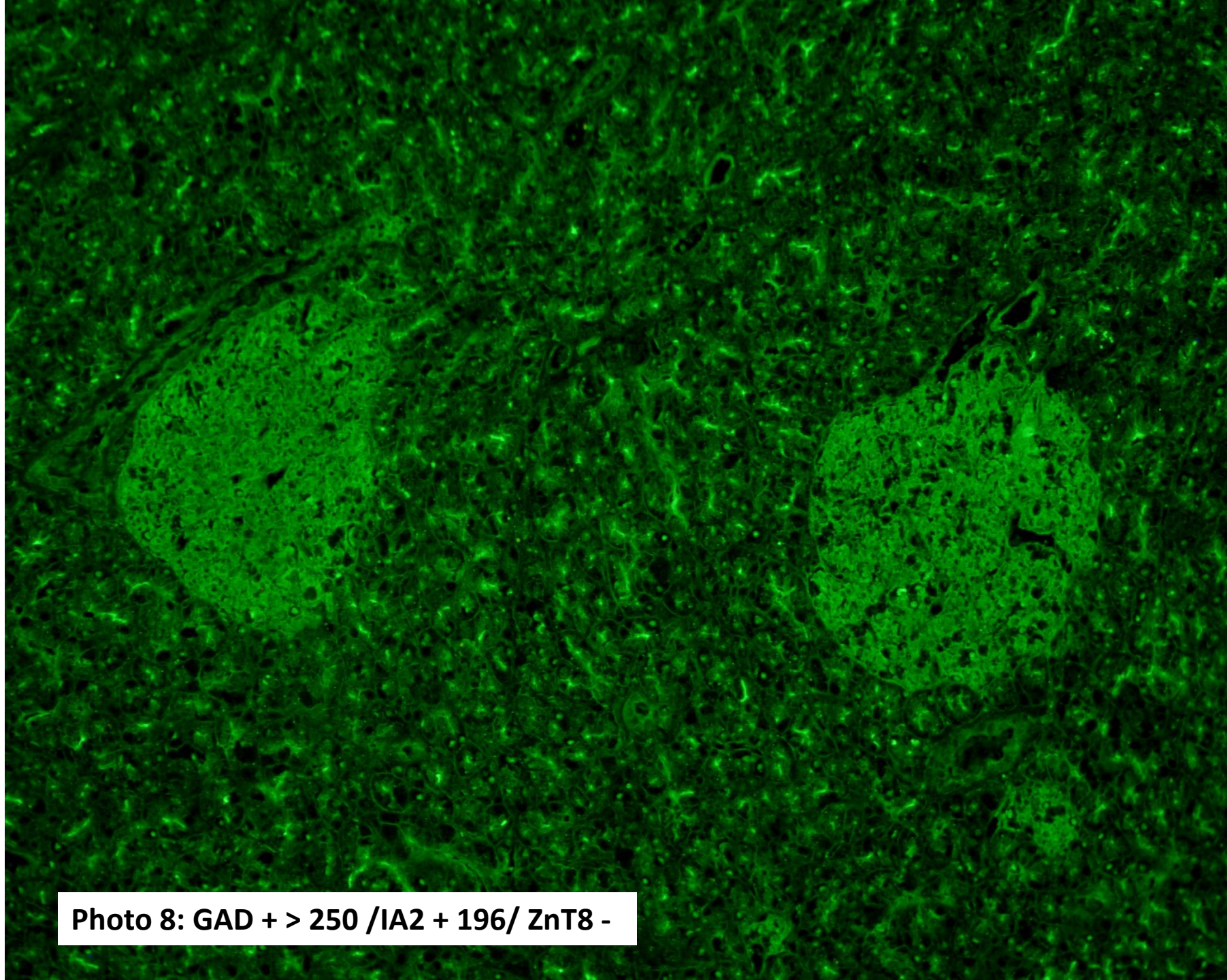


Photo 8: GAD + > 250 /IA2 + 196/ ZnT8 -

