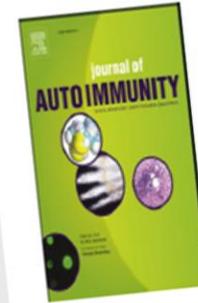




ELSEVIER

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm



Novel autoantibodies to the β -cell surface epitopes of ZnT8 in patients progressing to type-1 diabetes

Yong Gu^{a,1}, Chengfeng Merriman^{c,1}, Zheng Guo^c, Xiaofan Jia^a, Janet Wenzlau^a, Hua Li^b,
Huilin Li^b, Marian Rewers^a, Liping Yu^{a,**}, Dax Fu^{c,*}

^a Barbara Davis Center for Diabetes University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO, USA

^b Department of Structural Biology, Van Andel Institute, Grand Rapids, MI, USA

^c 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

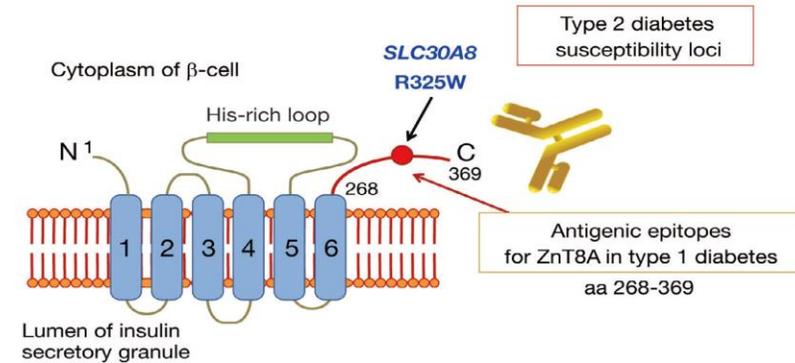
Protéines transporteurs des cations

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 β

Expression faible: lymphocytes, tissu adipeux sous cutané, cellules pancréatiques α

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

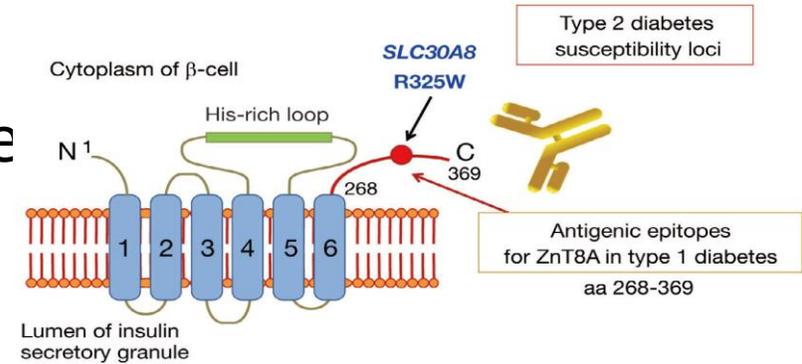
*Effet anti-oxydant et anti-apoptotique: rôle protecteur sur le pancréas

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**

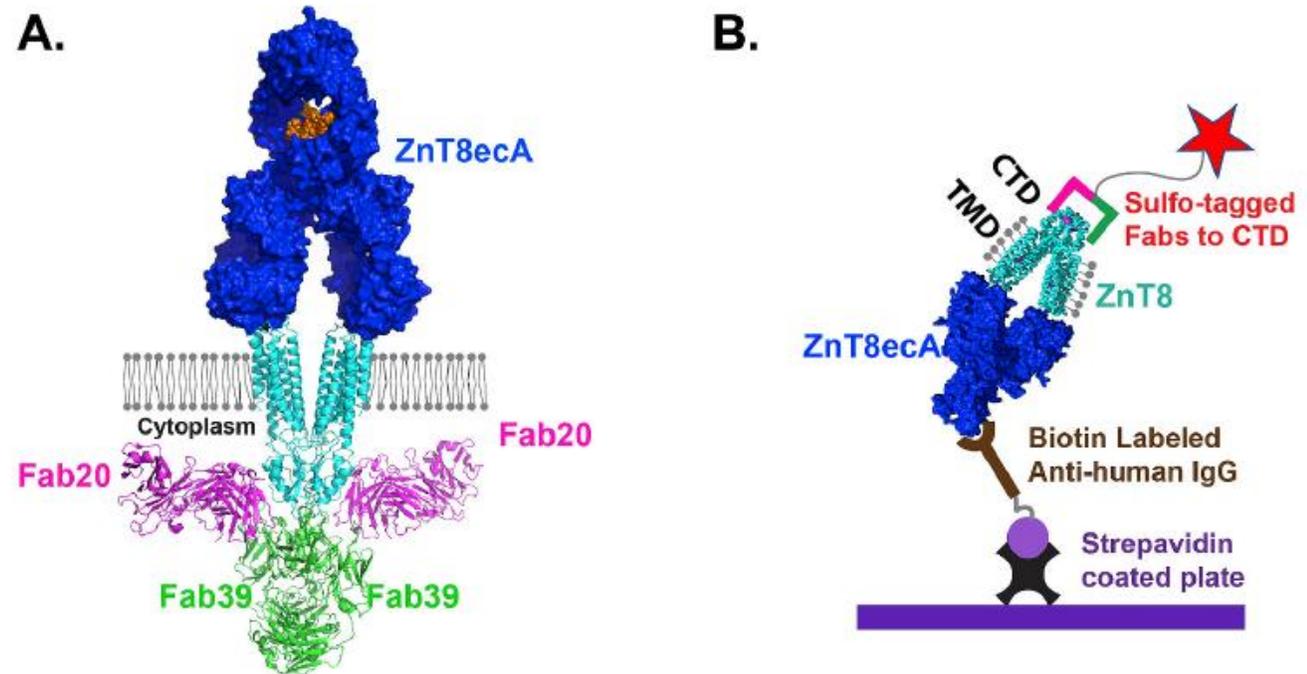
Protéine chimérique IA2-ZnT8WR (2 polymorphismes principaux de ZnT8)

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

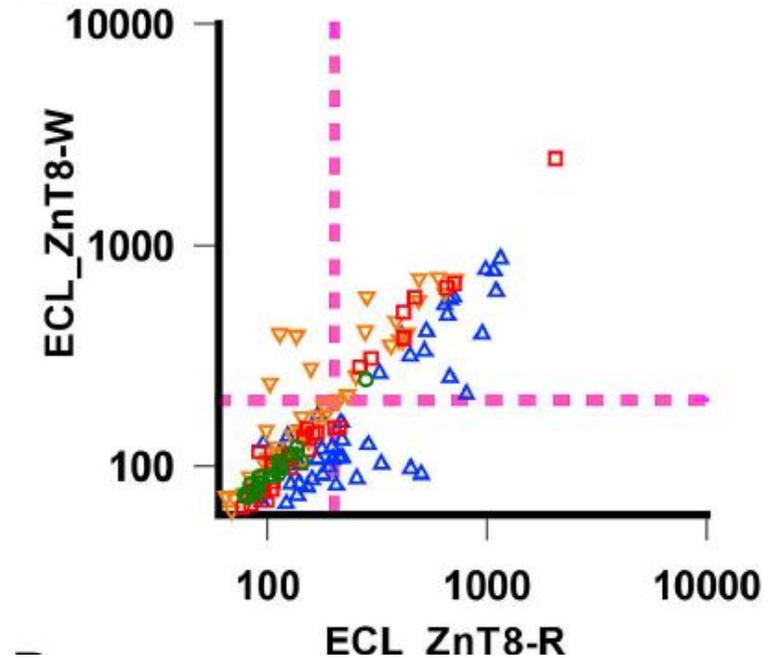
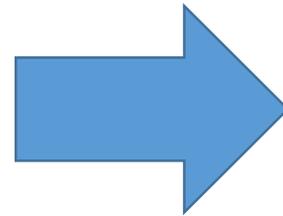
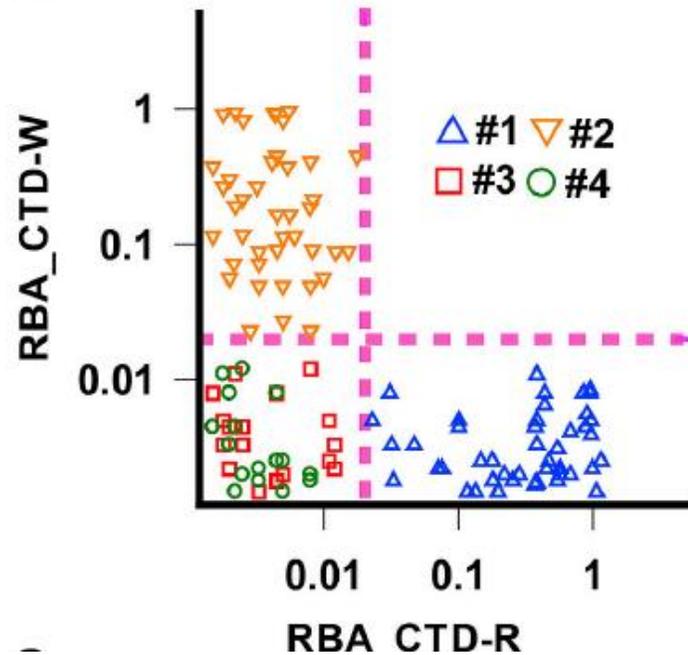
- Production de protéine ZnT8 native associée à un complexe de stabilisation
- Complexe de stabilisation avec fragments Fab de 2 anticorps monoclonaux anti-ZnT8ic.
- ZnT8 tronqué avec NTD de 13 AA seulement.

→ 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)

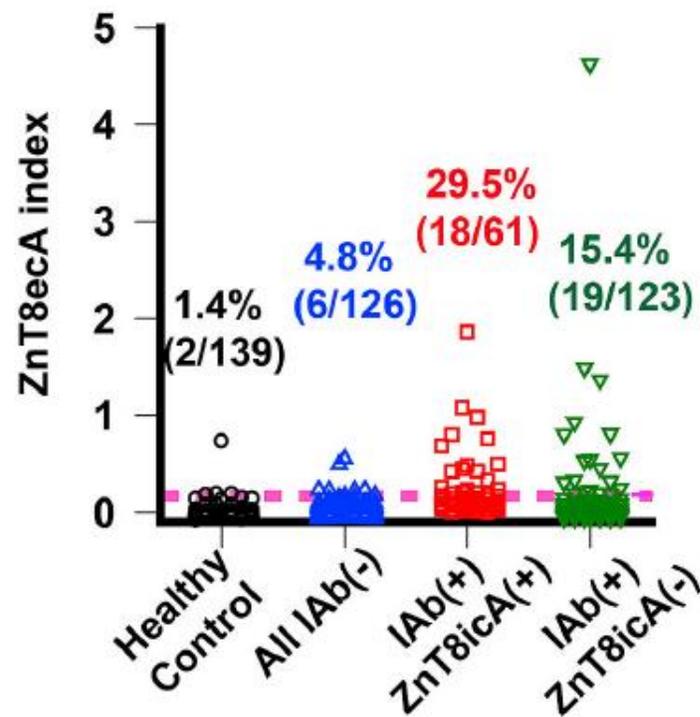
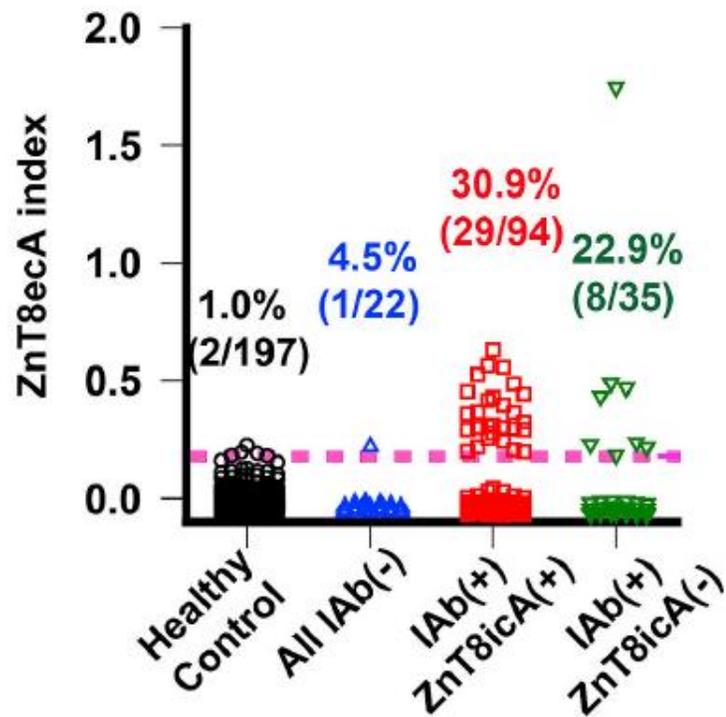
Réactivité croisée des anti-ZnT8ec pour les deux isoformes de ZnT8

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 ^a	IAb- DM	Control	T1DM ^b	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%

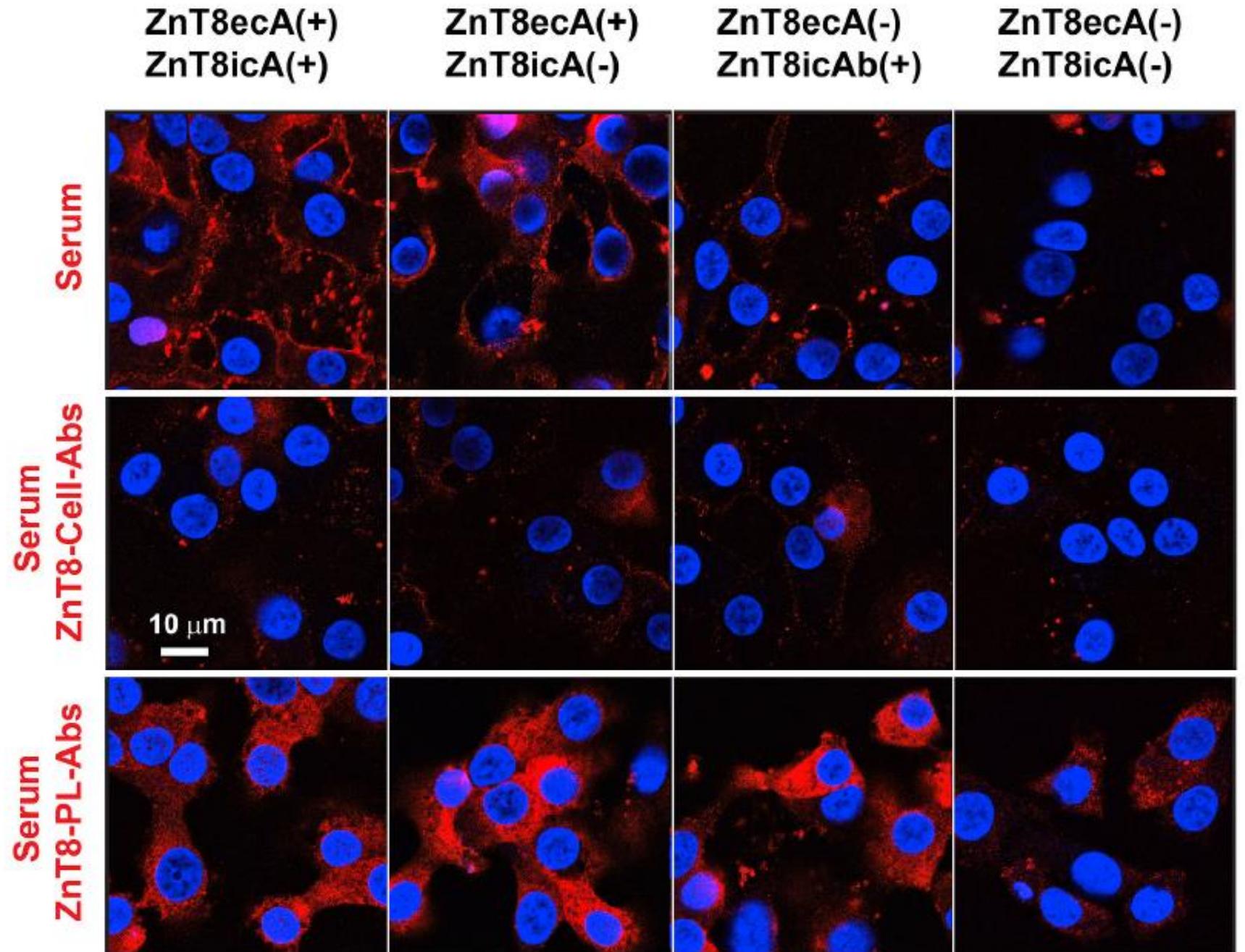


- Sensibilité : **23,6%**
- spécificité de **99 % / 336** sujets sains
- Indépendance anti-ZnT8ec et anti-ZnT8ic

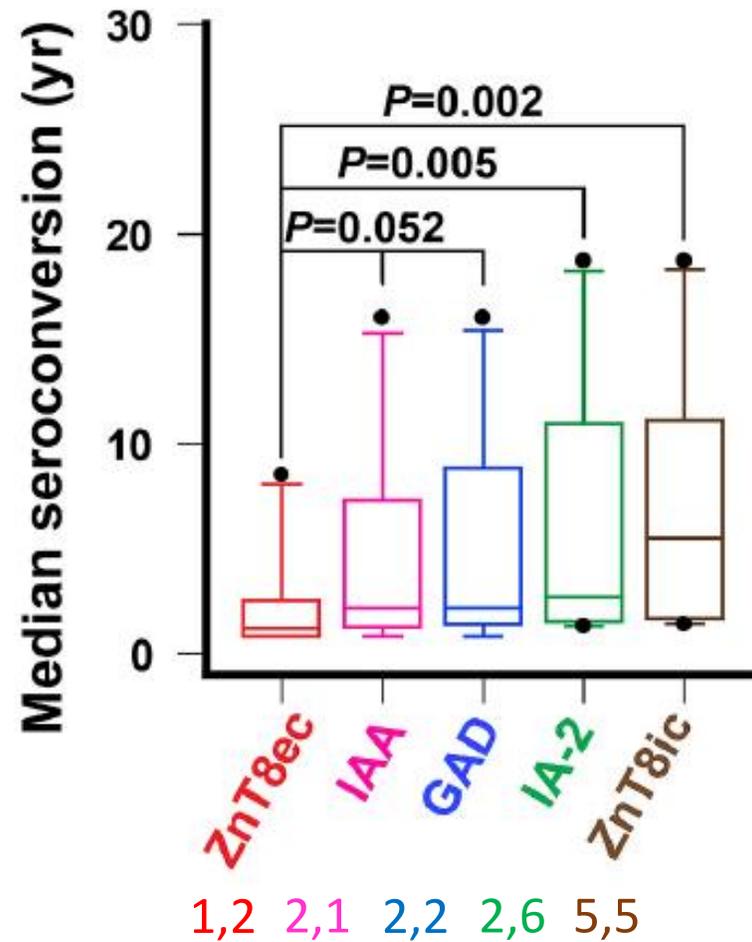
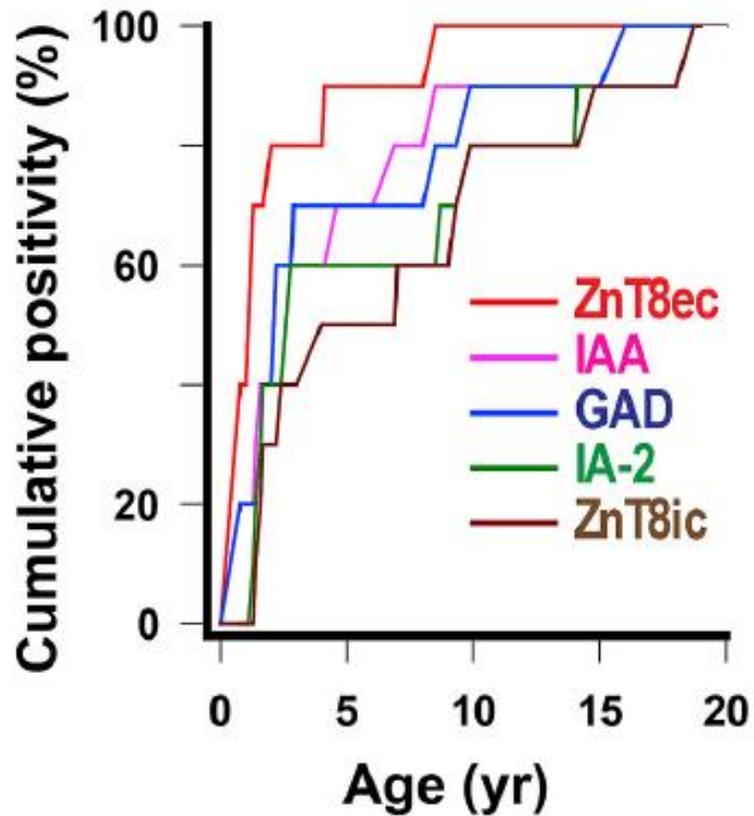
Confirmation par IFI sur cellules β

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^{ec}

- **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	

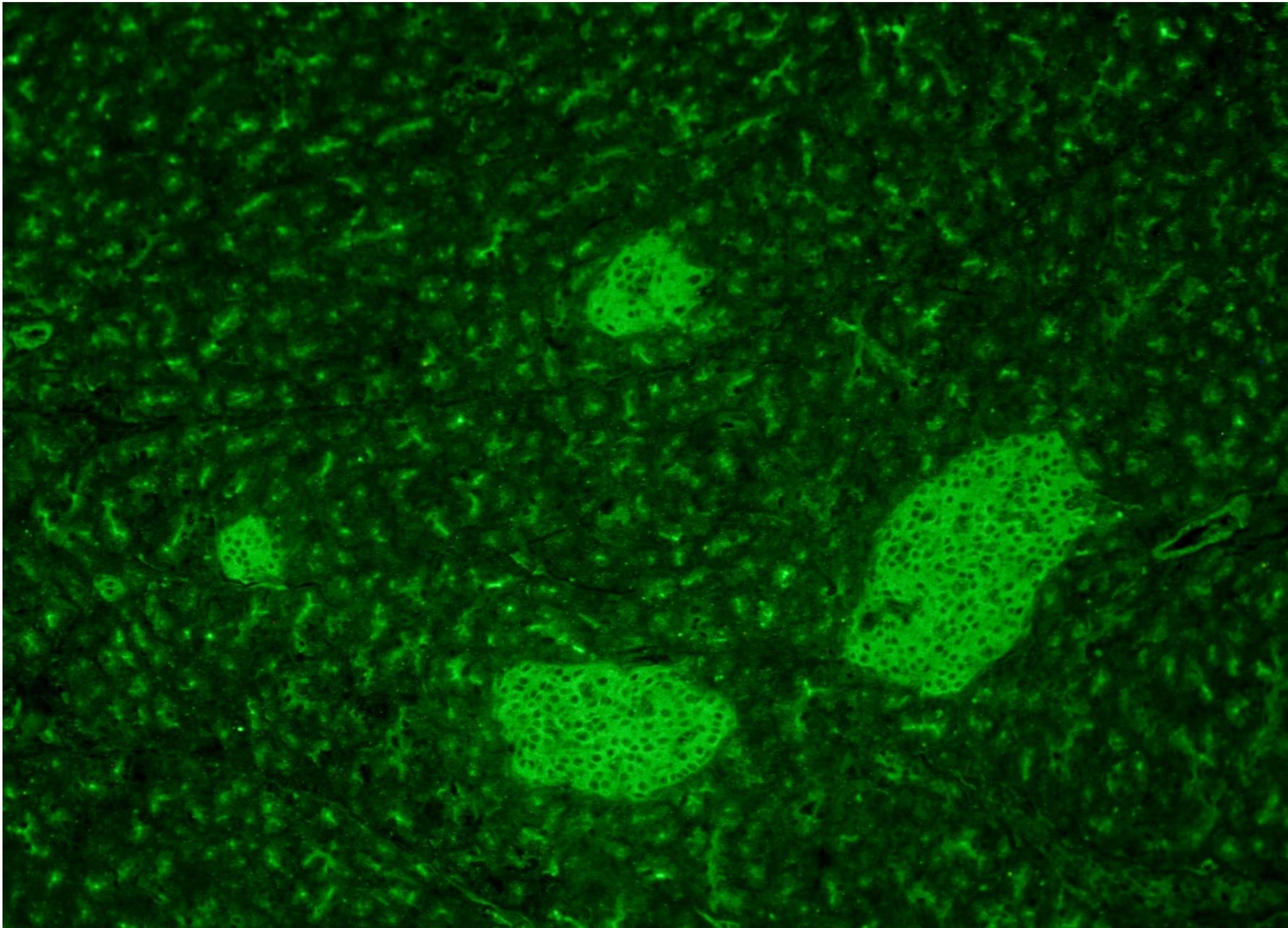


Photo 1: GAD -/IA2 + >200 / ZnT8 + >500

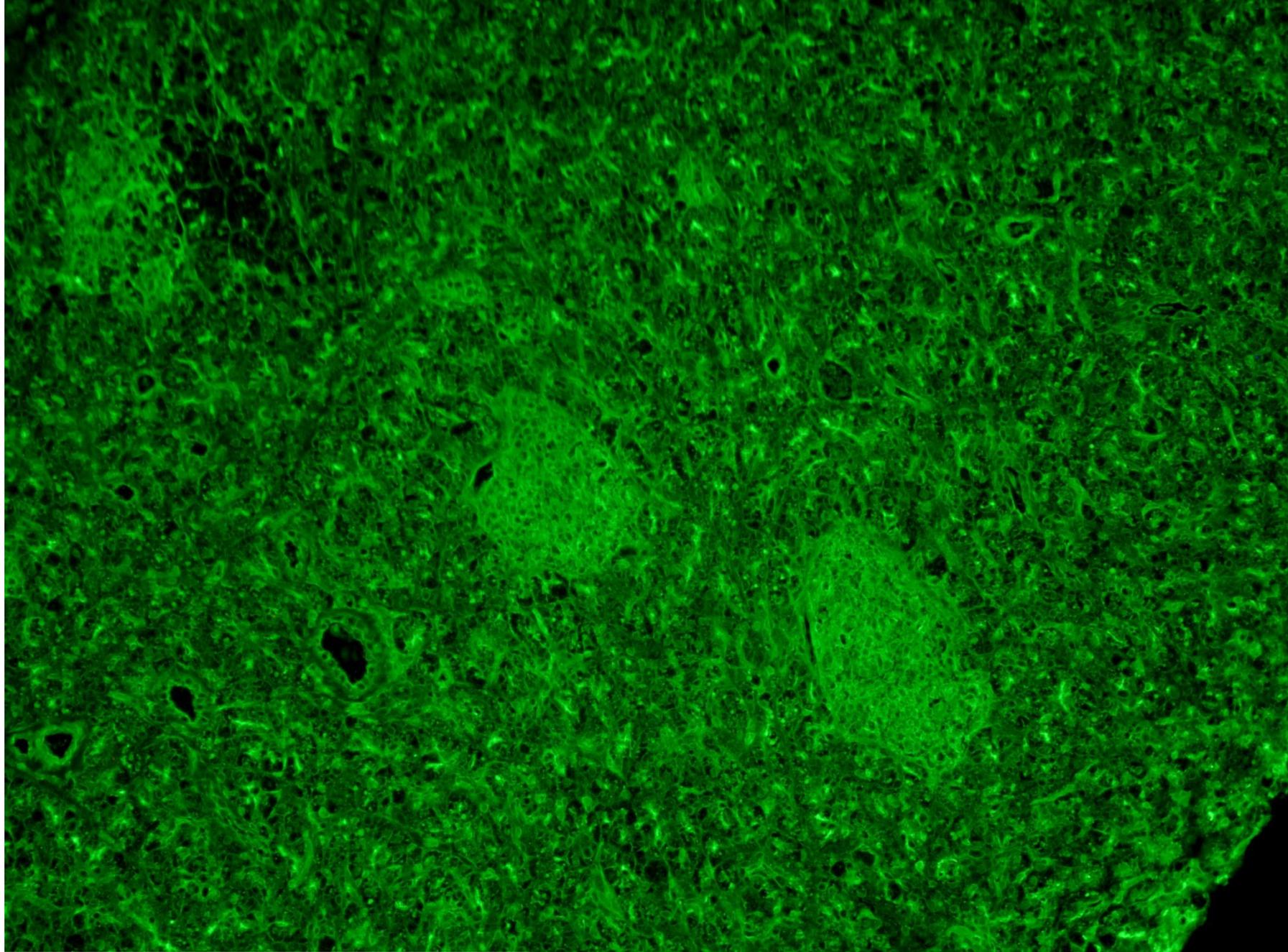


Photo 2: GAD + > 250 / IA2 -/ZnT8-

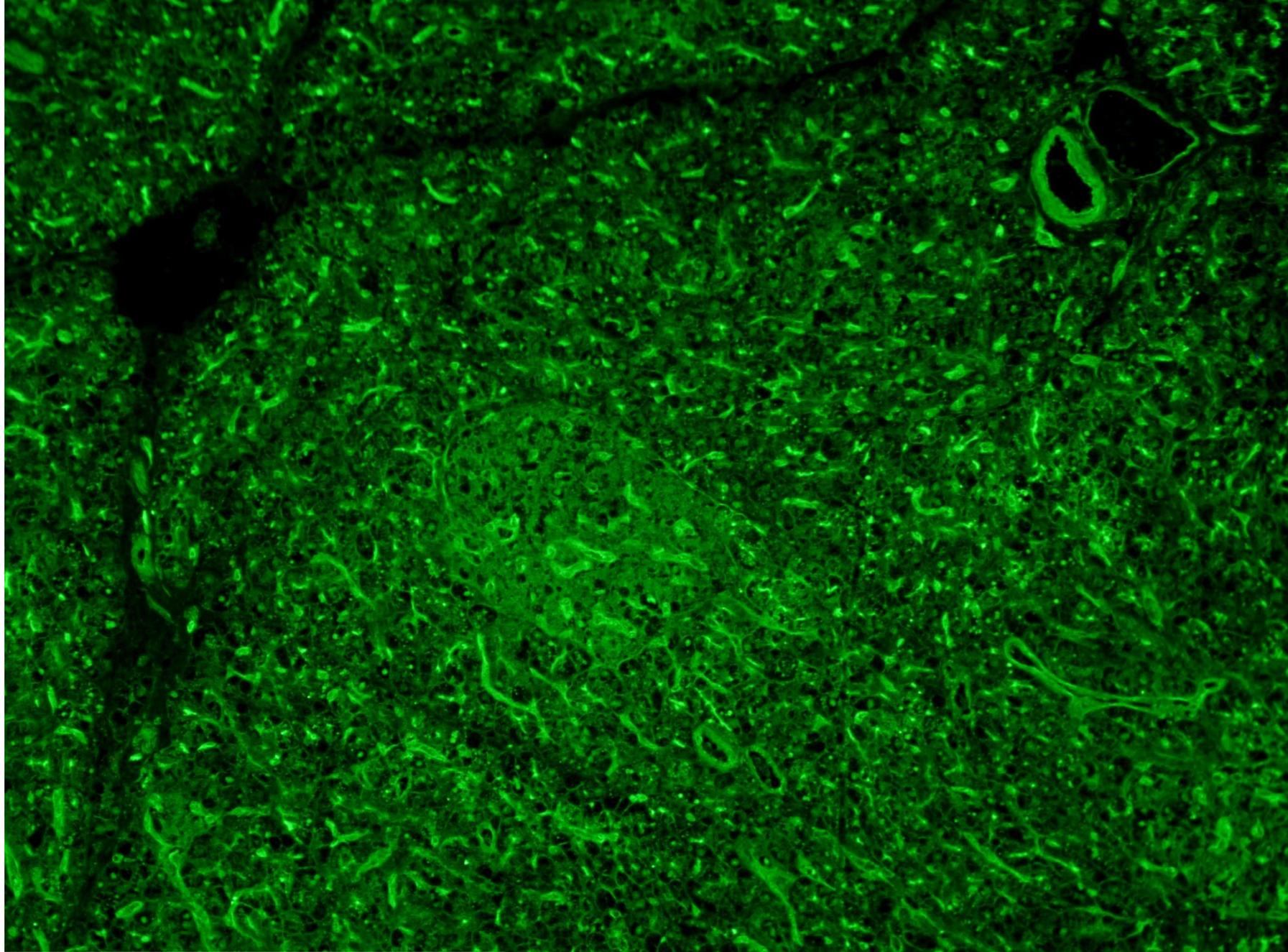


Photo 3: GAD + 233 / IA2 - / ZnT8 -

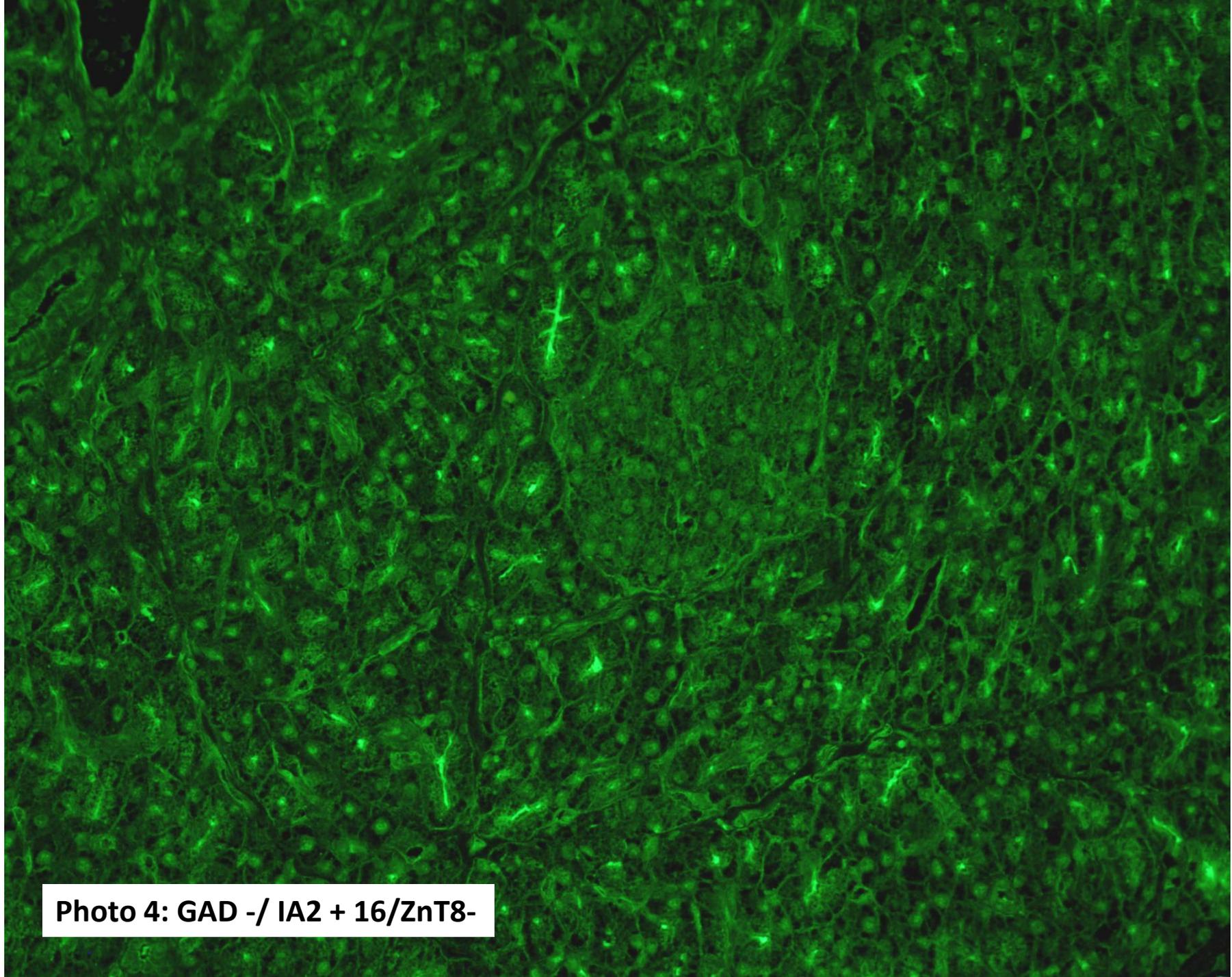


Photo 4: GAD -/ IA2 + 16/ZnT8-

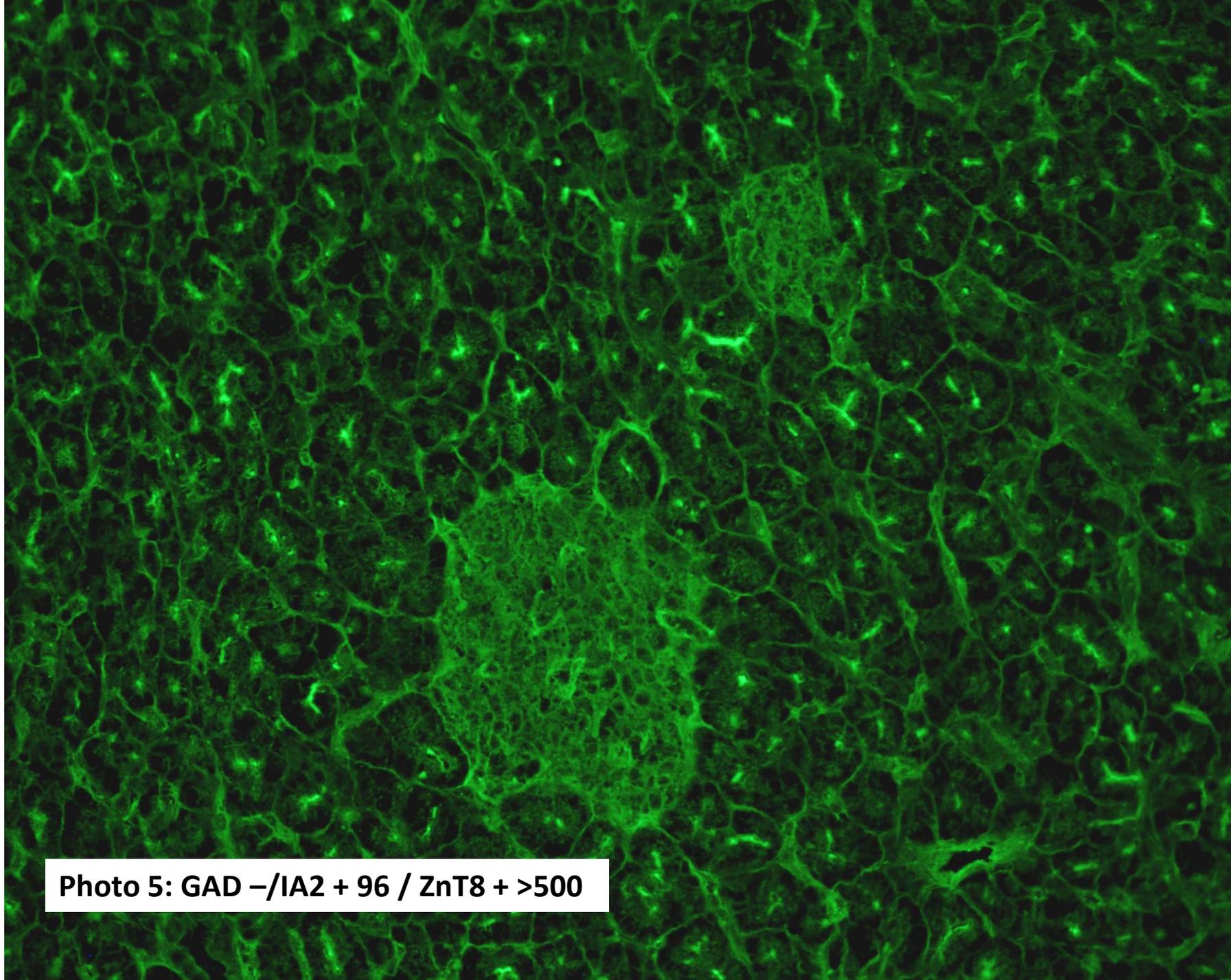


Photo 5: GAD -/IA2 + 96 / ZnT8 + >500

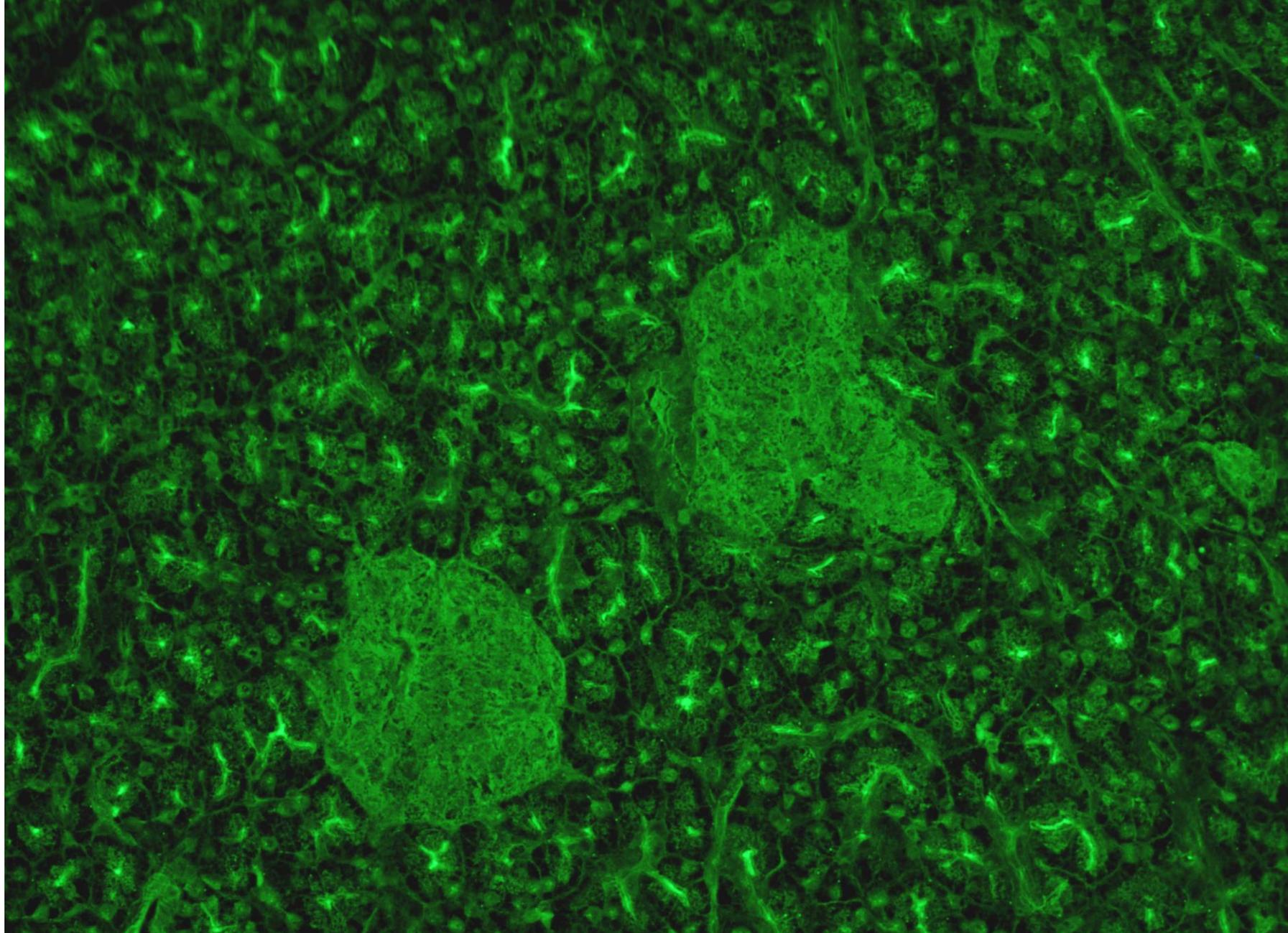


Photo 6: GAD + > 250 / IA2 + > 200/ ZnT8 -

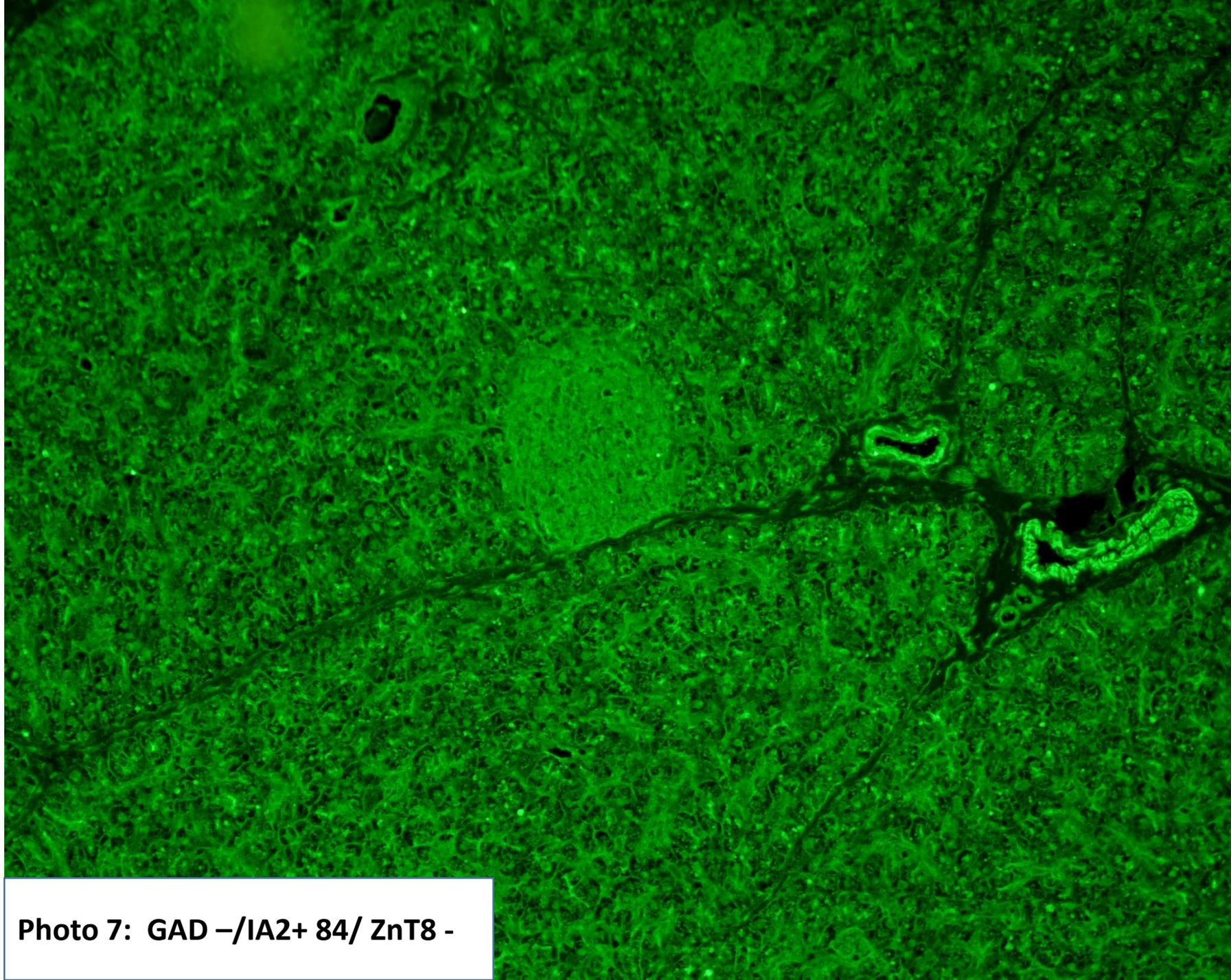


Photo 7: GAD -/IA2+ 84/ ZnT8 -

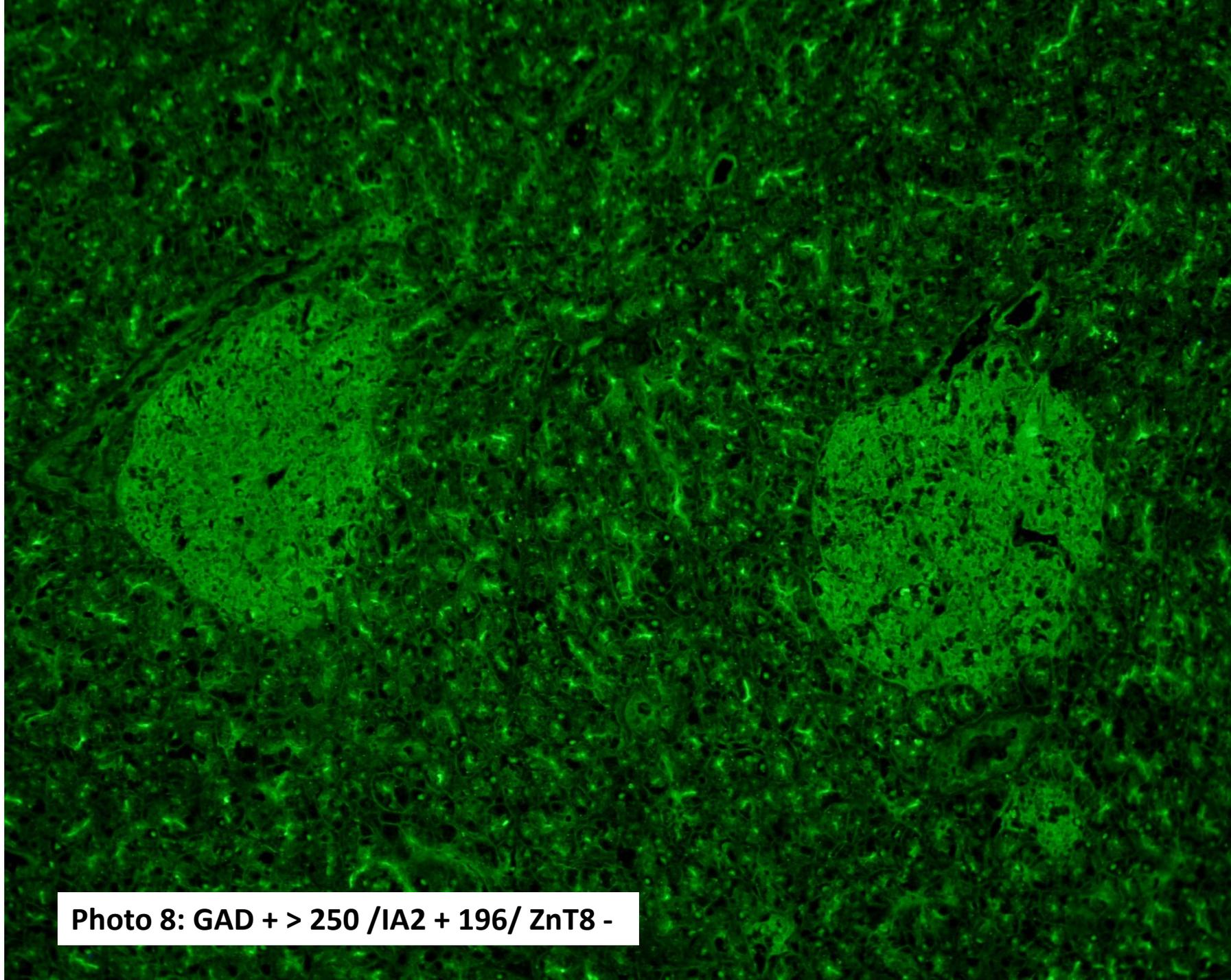


Photo 8: GAD + > 250 / IA2 + 196 / ZnT8 -

