



BU bibliothèque Lyon 1

<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2012

THESE n° 113

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2012

par

M. QUITTARD-PINON Arnaud

Né le 23/09/1986

A Aix en Provence (13)

**DETECTION DES AUTOANTICORPS ANTI-GANGLIOSIDES ASSOCIES AUX
NEUROPATHIES PERIPHERIQUES AUTO-IMMUNES :
EVALUATION DE 4 TESTS COMMERCIAUX**

JURY

Pr. BIENVENU Jacques, Professeur d'immunologie – Praticien Hospitalier

Dr. CAUDIE Christiane, Docteur ès sciences pharmaceutiques, Biologiste, Praticien Hospitalier

Dr. VIAL Christophe, Neurologue, Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. A. BONMARTIN
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Guy ANNAT
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. Jean-François MORNEX
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Daniel SIMON

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : M. François-Noël GILLY
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. Pierre FARGE

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. François GIERES
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Claude COLLIGNON
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christian COULET
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directrice : Mme MAUME-DESCHAMPS
I.U.F.M.	Directeur : M. Régis BERNARD

Mars 2011

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Jean-François SABOT (Pr)
Monsieur Alain BANNIER (MCU)
Monsieur Philippe BERNARD (MCU)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Raphaël TERREUX (MCU – HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (PAST)

- **PHARMACIE GALENIQUE - COSMETOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
Madame Valérie BERTHOLLE (MCU)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
Madame Karine PORET-PADOIS (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Monsieur Henri DECHAUD ((MCU - PH - HDR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAQUI MOUMJID (MCU)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

Mars 2012

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
- **HYGIENE, ENVIRONNEMENT ET BIOSECURITE**
Monsieur Dominique TREPO (MCU - PH - HDR)
- **DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)
Monsieur François COMET (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU - HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Anne-Emmanuelle DE BETTIGNIES (MCU)
Madame KERZAON Isabelle (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle MOUCHOUX (AHU)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Madame Léa PAYEN (MCU - HDR)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (AHU)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Jean-Marie VAUGEOIS (Pr)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL-CHATELAIN (MCU - HDR)
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Paul ROUZAIRE (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE et MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (AHU)
Madame Marie-Andrée MAZOYER (MCU - HDR)
Mme Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Madame Anne-Françoise PETAVY (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU)
Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)

Mars 2012

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (Pr)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Madame Marie VILLEDIEU (MCU)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU, chaire d'excellence)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)
Madame Valérie VOIRON (PAST)

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Madame Natalie CARTISER	85 ^{ème} section
Monsieur Waël ZEINYEH	86 ^{ème} section
Monsieur Antony ZOROPOGUI	87 ^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Mars 2012

REMERCIEMENTS

Au Président de thèse,

Monsieur le professeur Jacques BIENVENU,

Professeur d'immunologie à la faculté de pharmacie de Lyon – Praticien Hospitalier aux Hospices Civils de Lyon

Pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette thèse.

Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

A ma Directrice de thèse,

Madame le Docteur Christiane CAUDIE,

Docteur ès sciences pharmaceutiques- Biologiste- Praticien Hospitalier aux Hospices Civils de Lyon

Pour la confiance qu'elle m'a témoignée en me proposant ce travail.

Pour ses conseils avisés pendant l'élaboration de cette thèse.

Pour m'avoir initié à la recherche scientifique.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma gratitude pour son aide et sa disponibilité.

Qu'elle soit assurée de mon profond respect.

Au membre du jury,

Monsieur le Docteur Christophe VIAL,

Docteur en Médecine - Praticien Hospitalier aux Hospices Civils de Lyon

Pour avoir accordé de l'intérêt à ce travail de recherche.

Pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Je remercie également tout le **personnel de l'unité d'auto-immunité du laboratoire d'immunologie du centre hospitalier Lyon Sud** ; à commencer par Madame le **Docteur Nicole Fabien** pour avoir accepté ma demande de stage et ainsi permis de travailler dans son unité. Je la remercie aussi pour la confiance qu'elle m'a toujours accordée.

Je remercie les **techniciens**: Jérôme Fernandez, Gilles Jouvenel, Annick Moreira, Annick Labrosse, Catherine Lisito, Sophie Quang, Geneviève Chenard et Sophie Veber ; qui ont su être patients et bons pédagogues.

Je remercie les **internes et stagiaires**, Anne-Gaëlle Dron, Emilie Plantamura, Gwenaëlle Schonering; qui m'ont fait partager leurs savoirs et leurs expériences.

Je remercie les **cadres de santé**, Huguette Gallet et Edward Gros, qui m'ont présenté les lieux et intégré à l'équipe du laboratoire au cours de ces 6 mois de stage.

Je tiens à remercier tout le personnel de l'unité R&D et marketing des laboratoires **Bühlmann** (Bâle), et particulièrement Monsieur le docteur **Renato Cotti** pour sa disponibilité et ses précieuses remarques au cours de mon premier stage de M1.

Je n'oublie pas non plus monsieur le docteur **Dirk Roggenburk** des laboratoires **Generic Assays** ainsi que toute son équipe qui m'ont accueilli au cours de mon stage industriel de M2. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir ainsi permis de mener ce travail à son terme.

Par l'intermédiaire de ce travail, qui clôture toutes mes années d'études de pharmacie, je tiens également à présenter mes remerciements à :

Mes parents : Anne et François,

Considérez ce travail comme l'aboutissement de mes études et espérons-le comme le début de mon indépendance !

Soyez remerciés pour la confiance, le soutien et l'amour que vous m'avez témoignés, et pour cette liberté que vous m'avez toujours laissée.

Qu'ils voient en ce travail le fruit d'un devoir bien rempli.

Ma sœur Aude,

Merci de m'avoir toujours soutenu même dans les moments les plus difficiles durant ces longues et laborieuses études. Pour avoir toujours eu foi en moi alors que je n'y croyais plus moi-même.

A ma famille, cousins/ cousines, oncles et tantes,

Pour votre soutien régulier au cours de mes études

A mes amis d'enfance et du lycée : Olivier Bernard, Stéphane Rocher, Benoit Galéa Laurent Uzel, Hubert de Feraudy

Pour votre fidélité et votre amitié sincère qui ne faiblit pas avec le temps.

A mes collègues et amis de faculté et particulièrement Frédéric Cambriels, Laurent Jacqueroud, Natacha Duc, Amandine Baudoin, Laure Paravisini, Alix Boissonet, Emilie Chriv, Jérémy Saby, Rémi Chauvin, Yohann Furnon (...) et aux collègues de l'amicale.

Pour vos bons conseils mais aussi pour tous nos délires et folies au cours de toutes ces nombreuses soirées ;-) !

Je remercie encore toutes ces personnes, pour leur bonne humeur, leurs expériences et leurs encouragements. Je m'excuse d'avance pour les amis que j'aurais omis.

Sans oublier...

Toutes celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à construire la personne que je suis devenue.

TABLE DES MATIERES

- Liste des figures	12
- Liste des tableaux	13
- Liste des principales abréviations utilisées.....	14
- Avant-propos	15
- Introduction	15

Partie 1 : Connaissance du sujet

1. Les neuropathies périphériques

- Définition	16
- Incidence	16
- Classification.....	16
- Clinique	16
- Examen électrophysiologique	17
- Examens biologiques	18
- Diagnostic étiologique	19

2. Les neuropathies périphériques auto-immunes à activité anti-gangliosides

2.1 Les anticorps anti-gangliosides et leurs cibles 20

- Définition.....	20
- Structure et classification.....	20
- Autres anticorps mineurs associés : sulfatides et galactocérebrosides.....	21
- Fonctions.....	21
- Rôle physiopathologique.....	21
- Origine des Ac anti-gangliosides. Mimétisme moléculaire.....	21
- Profils d'autoanticorps caractéristiques des neuropathies auto-immunes.....	22
- Complexes anti-gangliosides.....	23

2.2 Les techniques de détection des anticorps anti-gangliosides 23

2.2.1- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	23
2.2.2- La technique d'agglutination sur latex et cytométrie de flux	23
2.2.3- La technique ELISA	23
2.2.4- La technique d'immunodot sur membrane	23/24
-Technique maison	
-Tests immunodots commerciaux	

2.3 Neuropathies périphériques associées aux anticorps anti-gangliosides 25

2.3.1- Le syndrome de Guillain-Barré ou polyradiculonévrites aiguës et variants 25

- Historique	25
- Définition et épidémiologie	25
- Etiologie	25

- Clinique	25/26
- Formes cliniques	26/27
-Polyradiculoneuropathie aigue démyélinisante (AIDP)	
-Forme motrice axonale : AMAN	
-Forme sensitivomotrice axonale : AMSAN	
-Forme SMF	
-Forme bulbaire	
-Profils autoanticorps anti-gangliosides rencontrés	27
-Thérapeutique	28
-La plasmaphérèse	
-Les Ig IV	

2.3.2- Les neuropathies périphériques auto-immunes chroniques

a) NMMBC : Neuropathie Motrice Multifocale avec Blocs de Conduction	29
b) Les neuropathies périphériques associées à une IgM monoclonale.....	30
- Les neuropathies périphériques à IgM monoclonale à activité anti-MAG.....	30
- Les neuropathies périphériques à activité anti-gangliosides	30/31
- GM1	
-gangliosides disialylés : CANOMAD	

Partie 2 : Travail personnel

1. Matériel et méthodes

1.1- Les sérums de patients : critères de sélection	32
1.2- La technique d'immunodot maison de dépistage des Ac anti-gangliosides	33
1.3- Les tests diagnostiques de dépistage des Ac anti-gangliosides	
-1.3.1 Le test Dotzen-Zentech	33
-1.3.2 Le test Euroimmun	34
-1.3.3 Le test Generic Assays	35
-1.3.4 Le test Bühlmann	35

2. Résultats

2.1 Les sérums testés.....	36/37
2.2 Performances analytiques des tests diagnostiques.....	38
2.2.1 Praticabilité des coffrets testés	38/39
2.2.2 Reproductibilité des coffrets testés	40
2.3 Performances diagnostiques des tests à établir les profils anticorps anti-gangliosides caractéristiques	
. 2.3.1 Sensibilité des tests: techniques de dilutions limites des sérums contrôles	
-Sensibilité des tests pour les Ac de classe IgM (technique maison, test GA).....	40
-Sensibilité des tests pour les Ac de classe IgG (technique maison, test GA)	41-42
2.3.2. Les profils Ac anti-gangliosides obtenus avec les 4 tests pour le sérum de contrôle intra-laboratoire de classe IgM (patient MAI)	42-43

2.3.3 Les profils Ac anti-gangliosides obtenus avec les 4 tests pour le sérum de contrôle intra-laboratoire de classe IgG (patient SAP).....	44-45
2.3.4 Sensibilité diagnostique des 4 tests à identifier les profils anti-gangliosides spécifiques de classe IgM	46-47
2.3.5 Tableau récapitulatif des sensibilités de classe IgM	48
2.3.6 Sensibilité diagnostique des 4 tests à identifier les profils anti-gangliosides spécifiques de classe IgG	49/50
2.3.7 Tableau récapitulatif des sensibilités de classe IgG	51
2.3.8 Spécificité.....	51
2.3.9 Performances diagnostiques : interprétation	51/54
2.4 Les points pour améliorer les performances des tests	55
3 Discussion	56
Conclusion	57
Bibliographie	58-61
Annexe	62-88

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation graphique des différentes neuropathies périphériques	19
Figure 2 : Principaux gangliosides impliquées dans les neuropathies périphériques.....	21
Figure 3 : Les gangliosides impliqués dans le syndrome CANOMAD selon Yoshikawa	31
Figure 4a : Le profil Ac anti-gangliosides (patient MAI) selon la technique maison aux dilutions 1/1000, 1/10 000, 1/100000.....	41
Figure 4b : Le profil Ac anti-gangliosides (patient MAI) obtenu par le test Generic Assays aux dilutions : 1/100, 1/500, 1/1 000, 1/5 000, 1/10 000, 1/20 000	41
Figure 5a : Le profil Ac anti-gangliosides (patient SAP) selon la technique maison aux dilutions 1/100 et 1/1000	42
Figure 5b : Le profil Ac anti-gangliosides (patient SAP) obtenu par le test Generic Assays aux dilutions 1/50, 1/100 et 1/200	42
Figure 4c : Le profil Ac anti-gangliosides (patient MAI) obtenu par le test Dotzen/Zentech	43
Figure 4d : Le profil Ac anti-gangliosides (patient MAI) obtenu par le test Euroimmun	43
Figure 4e : Le profil Ac anti-gangliosides (patient MAI) obtenu par le test Bühlmann	43
Figure 5c : Le profil Ac anti-gangliosides du patient SAP obtenu par le test Ingen	44
Figure 5d : Le profil Ac anti-gangliosides du patient SAP obtenu par le test Euroimmun...	45
Figure 5e : Le profil Ac anti-gangliosides du patient SAP obtenu par le test Bühlmann	45
Figure 6 : Exemple de profils Ac de classe IgM obtenu par le test Generic Assays	46
Figure 7 : Exemple de profils Ac de classe IgM obtenus par le test Dotzen/Zentech	47
Figure 8 : Exemple de profils Ac de classe IgM obtenus par le test Euroimmun	47
Figure 9 : Exemple de profils Ac de classe IgG obtenus par le test Generic Assays	49
Figure10 : Exemple de profils Ac de classe IgG obtenus par le test Dotzen/Zentech	49
Figure 11 : Exemple de profils Ac de classe IgG obtenus par le test Euroimmun	50
Figure 12 : Représentation graphique illustrant le nombre de gangliosides positifs pour les 12 profils IgG sur chacun des tests.	54
Figure 13 : Représentation graphique illustrant le nombre de gangliosides positifs pour les 21 profils IgM sur chacun des tests	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des atteintes mesurées par l'ENMG.....	18
Tableau 2 : Les profils anti-gangliosides testés obtenus par la technique maison pour chaque neuropathie périphérique	37
Tableau 3 : Caractéristiques des tests comparés à celles de la technique maison	38
Tableau 4 : Critères de positivité minimaux et recommandés pour l'interprétation	40
Tableau 5 : Les profils Ac anti-gangliosides obtenus par les 4 tests diagnostiques pour le sérum contrôle de classe IgM (patient MAI)	44
Tableau 6 : Les profils Ac anti-gangliosides obtenus par les 4 tests pour le sérum contrôle de classe IgG (patient SAP)	45
Tableau 7 : Concordance des tests diagnostiques à identifier les profils IgM	48
Tableau 8 : Concordance des tests diagnostiques à identifier les profils IgG	51
Tableau 9 : Performances diagnostiques des tests : profils anti-gangliosides spécifiques obtenus à l'aide de la technique maison et des 4 autres tests en utilisant les critères de positivité	53

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

Ac: Anticorps

AIDP: Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy

AMAN: Acute Motor Axonal Neuropathy

AMSAN: Acute motor and Sensory Axonal Neuropathy

BSA: Bovine Serum Albumin

CANOMAD: Chronic Ataxic Neuropathy with Ophthalmoplegia, IgM paraprotein, cold Agglutinins and Disialosyl antibodies

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CMV : CytomégaloVirus

EBV : Epstein-Barr Virus

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EMG : Electromyogramme

EP : échange plasmatique

GalNAc : N-acétyl galactosamine

Glc : Glucose

IgG / IgM : Immunoglobuline G / Immunoglobuline M

Ig IV : Immunoglobulines (polyvalentes) intraveineuses

LOS : Lipooligosaccharides

HRP : Horseradish Peroxidase ou peroxydase de raifort

MAG : Myelin-Associated Glycoprotein

NeuAc : Acide sialique

NMMBC : Neuropathie Motrice Multifocale à Blocs de Conduction

NPs /m : Neuropathie Périphérique sensitive / motrice

NPAI/NPD : Neuropathie Périphérique Auto-Immune/ Dysimmunitaire

PRNA : Polyradiculonévrite Aigue

SAN : Sensitive Ataxiant Neuropathy

SGB : Syndrome de Guillain-Barré (GBS)

SGLPG : Sulfoglucoronyl (Lactosaminy) Paragloboside

SMF: Syndrome de Miller-Fisher (MFS)

PVDF : Polyvinylidène Difluoride

TMB : Tétraméthylbenzidine

Avant-propos

Lors de mon stage hospitalo-universitaire de six mois d'octobre 2010 à mars 2011, au laboratoire d'Immunologie dans l'unité auto-immunité de l'hôpital Lyon Sud, j'ai eu l'opportunité de travailler sur la détermination des autoanticorps anti-gangliosides dans les neuropathies périphériques avec le biologiste des Hôpitaux de Lyon, Christiane Caudie Dr ès Sciences Pharmaceutiques, spécialiste des maladies auto-immunes en neurologie.

Mon travail consistait à effectuer une expertise analytique et clinique concernant l'évaluation de quatre coffrets réactifs commerciaux utilisés pour le dépistage et la caractérisation des autoanticorps anti-gangliosides associés aux neuropathies périphériques auto-immunes dans le cadre du diagnostic et du suivi thérapeutique des patients.

A la suite de ce stage, c'est naturellement que j'ai souhaité poursuivre dans cette voie, en proposant ma candidature dans un premier temps chez Bühlmann puis chez Generic Assays, dans le but d'approfondir mes connaissances sur les autoanticorps associés aux neuropathies périphériques et de mettre en pratique mon savoir au sein de l'entreprise.

INTRODUCTION

Au cours de ces vingt dernières années, la caractérisation des neuropathies périphériques auto-immunes, a été améliorée grâce à la mise en évidence dans le sérum, d'auto-anticorps anti-gangliosides réagissant avec des antigènes du système nerveux périphérique.

La recherche de tels anticorps constitue une avancée significative en termes de la compréhension de la physiologie d'une part et de l'aide au diagnostic d'autre part.

Les gangliosides, famille nombreuse et complexe de molécules lipidiques couplées à des sucres, sont ubiquitaires dans tout l'organisme et sont abondants dans le système nerveux. Lorsqu'ils constituent la cible d'auto-anticorps, ceci se manifeste sur le plan clinique par l'apparition d'une neuropathie périphérique auto-immune.

Le but de notre travail est d'évaluer les tests diagnostiques présents sur le marché utilisés pour le dépistage des autoanticorps anti-gangliosides associés aux neuropathies périphériques auto-immunes dans le cadre du diagnostic et du suivi thérapeutique des patients. La finalité de cette expertise est pour le biologiste de choisir le test le plus adapté et le plus sensible de façon à optimiser au maximum le diagnostic.

La première partie de cette thèse consiste en une restitution des données bibliographiques relatives aux neuropathies périphériques auto-immunes anti-gangliosides ; nous verrons les aspects cliniques et électrophysiologiques des pathologies ainsi que les anticorps associés à ces neuropathies et les méthodes de détection de ceux-ci.

Dans la deuxième partie, mon travail personnel a consisté à l'évaluation des tests réactifs disponibles sur le marché.

Cette partie est structurée en trois points importants:

- 1) matériel et méthodes
- 2) Résultats
- 3) Discussion

PARTIE 1 : CONNAISSANCE DU SUJET

1. Les neuropathies périphériques

Définition

On entend par neuropathies périphériques une altération des fonctions du système nerveux périphérique (SNP). Ce système correspond aux neurones sensitifs, moteurs et aux neurones végétatifs, siégeant au niveau du tronc cérébral, et de la moelle. Il est constitué des corps cellulaires de ces neurones et des troncs nerveux périphériques, composés de fibres ou axones regroupés en fascicules. Chaque fibre nerveuse est constituée par un axone provenant d'un des corps cellulaires et d'une juxtaposition de cellules de Schwann. En fonction ou non de la présence d'une gaine de myéline autour des axones, on distingue des fibres nerveuses myélinisées et non myélinisées ou amyéliniques [1-2]. Toute anomalie de la fonction du système nerveux périphérique est secondaire à une atteinte de l'axone et/ou de la gaine de myéline ; on parle alors de neuropathies axonales, démyélinisantes ou mixtes.

Incidence

Les neuropathies périphériques sont fréquentes et surviennent chez environ 2.4% de la population [3]. Le taux d'incidence augmente avec l'âge.

Elles regroupent un ensemble d'atteintes très polymorphes des nerfs périphériques [1].

Les processus pathologiques qui affectent le système nerveux périphérique sont, la démyélinisation segmentaire, la dégénérescence neuronale ou axonale.

Classification

On distingue plusieurs catégories de neuropathies périphériques selon la répartition des signes et des symptômes :

- les mononeuropathies uniques (un tronc nerveux atteint) ou multiples (plusieurs troncs nerveux atteints)
- les polyradiculopathies et les polyneuropathies. Il s'agit d'atteintes diffuses et symétriques du SNP.

Les signes cliniques évocateurs comprennent une symptomatologie motrice et sensitive.

Pour établir une classification, il est important de reconnaître les signes cliniques et les autres symptômes accompagnant la neuropathie (sécheresse buccale, atteinte articulaire, splénomégalie, atteinte oculaire), de comprendre les circonstances d'installation (diabète, médicaments, infections, maladie rénale, maladie systémique), d'étudier la topographie (distale- proximale/ unilatéral- bilatéral), de préciser la répartition des troubles (moteurs, sensitifs), le mode d'installation (sévère, progressif) et le processus évolutif (aigu, subaigu, chronique).

Clinique

Le tableau clinique d'une neuropathie périphérique est généralement sensitivomoteur. Le plus souvent les manifestations sont sensitives, distales et symétriques, débutant aux membres inférieurs, mais elles peuvent parfois être asymétriques, multifocales ou débiter aux membres supérieurs.

Les neuropathies périphériques peuvent se révéler par des signes sensitifs (paresthésies, dysesthésies, hypoesthésie, ataxie) et/ou des signes moteurs (faiblesse, paralysie, crampes, fasciculations) et/ou des signes neurovégétatifs (maaises orthostatiques, troubles de la sudation, diarrhées...).

Examen électrophysiologique

L'examen électrophysiologique est une extension de l'examen clinique. L'électromyogramme (EMG) est fondamental pour comprendre le mécanisme physiopathologique et orienter la recherche étiologique. Il permet par stimulation des nerfs sensitifs et moteurs et par l'enregistrement des activités électriques d'un muscle de définir le site de la lésion et de préciser le type d'atteinte : axonale et/ou myélinique.

Le recueil de l'activité électrique du muscle se fait grâce à l'utilisation d'aiguilles électrodes que l'on dispose à la surface du muscle que l'on souhaite étudier.

L'électromyographie se déroule selon 2 étapes :

- L'étude de la conduction nerveuse dite de « stimulodétection » : La mesure des vitesses de conduction motrices et sensitives en stimulant le nerf en 2 points, l'électrode de réception est placée sur le corps d'un muscle innervé par le nerf étudié. Deux paramètres doivent être définis pour apprécier le type lésionnel :
 - la vitesse de conduction du nerf/ du muscle
 - l'amplitude ou la surface du potentiel de nerf/d'action musculaireLe recueil du potentiel sensitif sera réalisé de façon orthodromique et antidromique en détection monopolaire avec des électrodes-aiguilles.
- L'examen électromyographique EMG : il correspond à l'enregistrement de l'activité musculaire par insertion d'une aiguille-électrode dans le muscle. L'étude est faite au repos (activités spontanées) et lors de la contraction musculaire. Cet examen doit être le plus souvent complet, comportant une étude bilatérale des membres supérieurs et inférieur, parfois des muscles et du tronc et des nerfs crâniens. Il doit inclure des vitesses de conceptions nerveuses motrice et sensitive, des études de l'onde F et du réflexe H, une étude de l'EMG de repos et de contraction volontaire. La température cutanée doit être bien contrôlée.

L'EMG peut être complété par des techniques neurophysiologiques explorant aussi les voies centrales : PES (potentiels évoqués somesthésiques), PEM (potentiels évoqués moteurs), voire étude du réflexe de clignement, afin de mieux préciser l'étendue des lésions [1-2].

Le **tableau 1** résume les normes mesurées en fonction des caractéristiques de la neuropathie.

Tableau 1 : Récapitulatif des atteintes mesurées par l'ENMG [5].

	AXONOPATHIE		MYELINOPATHIE
	Aiguë N ou légèrement diminuée	Chronique N ou légèrement diminuée	
Vitesse de conduction motrice			Diminuée +++
Amplitude du potentiel moteur	Diminuée	Diminuée ++	Normale ou diminuée Bloc de conduction + ou- dispersion temporelle
Latence motrice distale	Normale	Normale ou légèrement allongée	Allongée ++
Onde F	Normale	Normale ou légèrement allongée	Allongée ++ ou absente
Vitesse de conduction sensitive	Normale ou légèrement diminuée	Légèrement diminuée	Diminuée ++
Amplitude du potentiel sensitif	Diminuée	Diminuée +++	Normale, diminuée ou absente

Examens biologiques

Les examens biologiques permettent de préciser l'étiologie [5 et 6].

Dans un premier temps, un examen biologique "standard" est réalisé afin d'explorer les causes les plus fréquentes de neuropathies périphériques :

- La numération formule sanguine est réalisée à la recherche d'une hémopathie ou d'une leucopénie
- La vitesse de sédimentation ainsi que la Protéine C Réactive (CRP) peuvent mettre en évidence la présence d'un syndrome inflammatoire.
- L'urée et la créatininémie permettent d'évaluer l'intégrité de la fonction rénale.
- La glycémie : à jeun et postprandiale, ainsi que l'hémoglobine glyquée (HbA1C) permettent de mettre en évidence un diabète. Les neuropathies diabétiques sont souvent décrites par des douleurs périphériques dues à une atteinte des petites fibres.
- Un bilan hépatique (Transaminases, PAL, gamma GT) est réalisé pour écarter une atteinte hépatique ainsi qu'une neuropathie toxique suite à la prise d'alcool.
- L'examen immunologique est composé par l'électrophorèse des protéines sériques qui met en évidence une restriction d'hétérogénéité et l'immunofixation qui identifie le type d'immunoglobuline impliquée. La découverte d'une gammopathie monoclonale impose une surveillance régulière, en raison de son potentiel de transformation en hémopathie maligne.
- La ponction lombaire permet l'étude du liquide céphalorachidien (LCR). Lors d'une neuropathie, il est courant de retrouver une hyperprotéinorachie $> 0,45$ g/L sans changement de la numération leucocytaire du LCR ($N \leq 2$ leucocytes/mm³), appelée aussi dissociation albumino-cytologique, qui témoigne d'une démyélinisation.
- La biopsie nerveuse (ou neuromusculaire) est habituellement réalisée au niveau du nerf sural (la cheville) ou du nerf radial superficiel du poignet. Elle a pour but d'établir un diagnostic de certitude précis, elle peut être une aide en cas de doute important sur le diagnostic mais est rarement pratiquée car cette méthode est invasive et coûteuse.

Diagnostic étiologique

Les étiologies sont multiples et posent un réel problème de diagnostic [3].

La **figure 1**, issue d'un poster projeté par LFB, d'après Y.Péreon [4] représente un éventail des différentes neuropathies périphériques tenant compte des différents facteurs précédemment évoqués. Il reflète toute la complexité d'établir une classification standard.

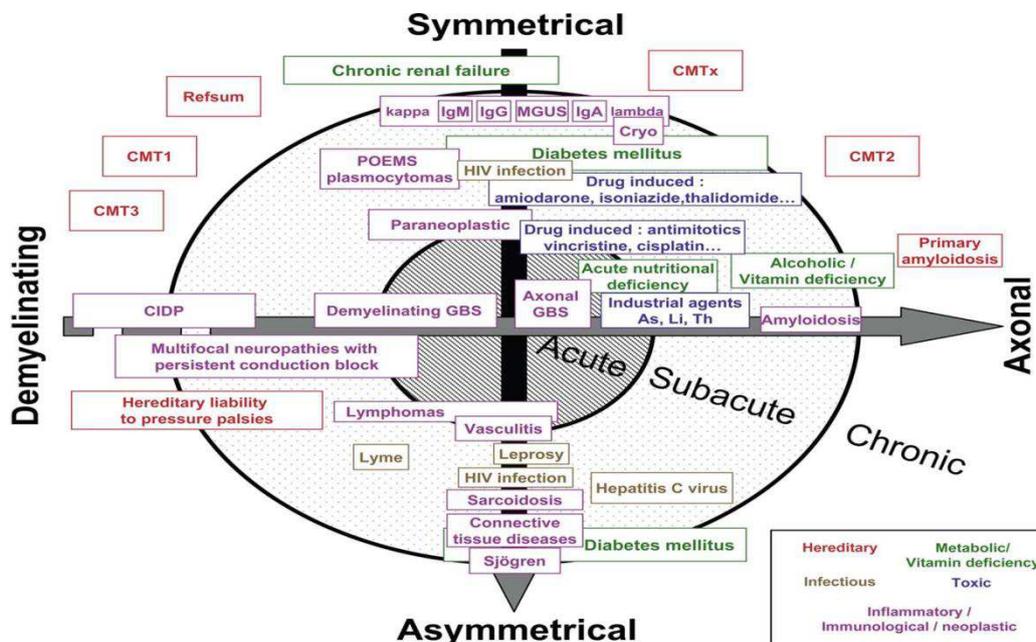


Figure 1: Représentation schématique des différentes neuropathies périphériques (LFB)

Parmi les neuropathies les plus fréquentes, nous pouvons citer:

- Les neuropathies métaboliques et endocriniennes : diabète, insuffisance rénale et hypothyroïdie. Ce sont de loin les plus fréquentes (environ 40% des NP)
- Les neuropathies nutritionnelles ou carencielles : alcoolisme, avitaminoses B1, B6, B12).
- Les neuropathies toxiques : médicaments (thalidomide, amiodarone, taxoïdes), agents industriels et environnementaux (hexacarbones, polyacrylamides, métaux lourds)
- Les neuropathies infectieuses (HIV, Lyme, lèpre)
- Les neuropathies héréditaires (Charcot-Marie-Tooth) et systémiques : vascularites
- Les neuropathies associées aux cancers par action directe ou paranéoplasique (hémopathies : lymphomes, leucémies, myélomes)
- Les neuropathies périphériques associées à des autoanticorps dites neuropathies dysimmunes ou autoimmunes.

Ces dernières (neuropathies dysimmunes) sont de connaissance récente. Elles représentent 10 à 15% des neuropathies périphériques. Nous nous focaliserons sur celles-ci.

Elles sont caractérisées par la présence d'autoanticorps anti-nerfs dirigés contre des structures glycoconjuguées présentes dans le système nerveux périphérique. Elles sont à différencier des neuropathies périphériques observées au cours des connectivites et des vascularites et qui sont souvent associées à d'autres autoAc (Ac antinucléaires, Ac anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles ou ANCA) [7 et 8].

On distingue :

- les neuropathies périphériques auto-immunes à activité anti-myéline dite anti-MAG.
- les neuropathies périphériques auto-immunes à activité anti-gangliosides.

2 Les neuropathies périphériques auto-immunes à activité anti-gangliosides.

2.1 Les anticorps anti-gangliosides et leurs cibles

Les anticorps anti-gangliosides sont dirigés contre des glycoconjugués du nerf périphérique, les glycolipides à acides sialiques appelés gangliosides.

Définition

Les gangliosides sont des glycosphingolipides. Ils sont composés de différentes chaînes oligosaccharidiques formées de galactose, de N-acétyl-galactosamine, de glucose et d'acide sialique, elles même liées à une partie lipidique, le céramide.

Les gangliosides sont ubiquitaires, ils sont présents à la surface de la membrane plasmique des cellules neuronales du système nerveux périphérique. Tandis que la partie hydrophobe est enchâssée dans la bicouche lipidique des membranes plasmiques, la partie hydrophile est dirigée vers le milieu extracellulaire. Ce sont des cibles antigéniques facilement accessibles aux autoanticorps circulants.

Structure et classification

Ils constituent une grande famille de molécules avec de nombreuses analogies structurales [9]. Ces gangliosides sont classés selon la nomenclature de Svennerholm établie en 1963 :

La lettre G pour ganglioside est suivie par les lettres M, D, T, Q selon le nombre d'acides sialiques (mono, di, tri, quadri-sialylés).

Le chiffre 1, 2, 3, 4 suivant correspondent respectivement à 4, 3, 2, 1 hexoses.

La lettre finale (a ou b) indique la position de l'acide sialique. La série « a » indique qu'il y a un seul acide sialique attaché au galactose interne. La série « b » indique qu'il y en a deux, il s'agit alors d'un ganglioside disialylé.

Exemple du GQ1b : G pour ganglioside, Q pour 4 résidus d'acide sialique, 1 pour la présence de 4 oses dans la chaîne, et « b » pour 2 acides sialiques attachés au galactose interne

On constate qu'il existe de nombreux épitopes communs entre ces différents gangliosides, ce qui va expliquer l'existence de nombreuses réactions croisées [9]. A titre d'exemple de réactivité croisée, le GD1b le GD3, GD2, GT1b et le GQ1b ont en commun d'un point de vue structural un résidu disialylé attaché au galactose interne (NeuNAc (α 2-8)-NeuNAc (α 2-3) Gal).

Il existe plus de 60 configurations dont une douzaine impliquées dans les neuropathies périphériques : GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD2 GD3, GT1a, GT1b, GT2, GQ1b.

La **figure 2** présente les principaux gangliosides impliqués dans les neuropathies périphériques (sources Generic Assays).

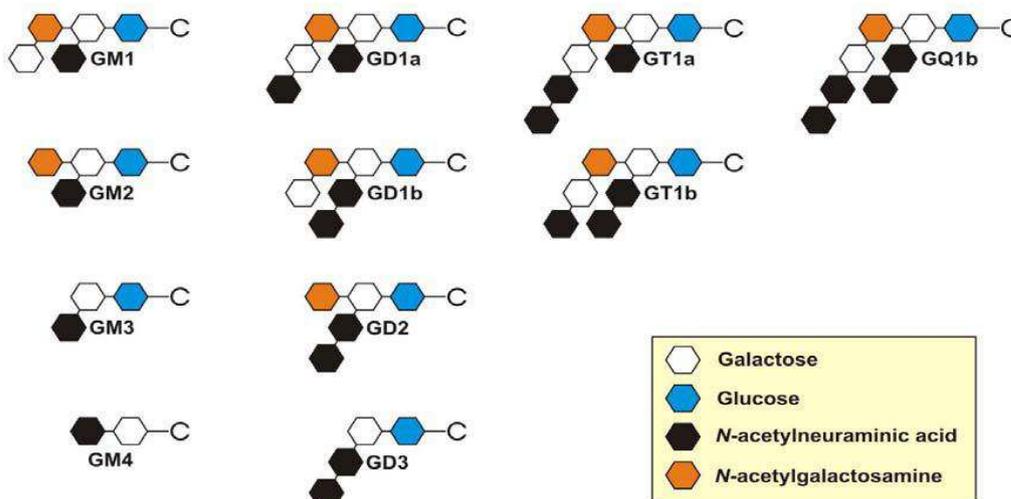


Figure 2 : Les principaux gangliosides impliqués dans les neuropathies périphériques.

Autres anticorps « mineurs » associés : sulfatides et galactocérebrosides

Sulfatides : Ce sont des sulfogalactocérebrosides, glycolipides acides majeurs de la myéline centrale et périphérique.

Galactocérebroside : C'est la structure la plus simple comprenant un seul sucre, le galactose sur la structure céramide. Il a été décrit comme la cible des anticorps dans le SGB faisant suite à une infection par le *Mycoplasme pneumoniae*. La non-spécificité de ces derniers n'en fait pas de bons marqueurs pour le diagnostic.

Fonctions

Ces molécules montrent des propriétés chélatrices du calcium Ca^{2+} dans plusieurs modèles membranaires. Elles sont impliquées dans le fonctionnement de base des cellules neuronales (adhérence, reconnaissance et liaison de nombreux ligands, récepteurs de facteurs de croissance) mais aussi dans la transduction des signaux et dans diverses interactions avec le système complément [10].

Rôle physiopathologique

Les réactions anti-gangliosides entraînent des altérations de la structure membranaire de la myéline par une action directe des anticorps et du complément activé.

L'étude électrophysiologique de Willison et al. sur la préparation de nerf phrénique, après transfert passif chez la souris d'une IgM monoclonale purifiée d'un patient atteint de neuropathie sensitive ataxiante, montre des dysfonctionnements de l'excitabilité nerveuse et de la neurotransmission [11].

Origine des anticorps anti-gangliosides. Mimétisme moléculaire

Les anticorps anti-gangliosides peuvent être de classe IgG ou IgM. Ils peuvent être polyclonaux (de classe IgG ou IgM) ou monoclonaux (de classe IgM uniquement), les anticorps polyclonaux étant les plus fréquents. Les anticorps de classe IgG apparaissent de façon transitoire suite à une infection et disparaissent en même temps que la récupération clinique. Ils sont associés à des neuropathies aiguës. Les anticorps de classe IgM, eux, sont l'apanage des neuropathies périphériques chroniques. Ils sont présents de façon persistante pendant plusieurs années, sous la forme d'une immunoglobuline monoclonale le plus souvent [9, 12, 13]. La cause de la présence d'auto-anticorps anti-gangliosides dans les neuropathies

périphériques chroniques est mal connue, contrairement aux neuropathies périphériques aiguës [5]. En effet, les autoanticorps décrits dans les PRNA sont produits après rupture de tolérance par mimétisme moléculaire. Le mimétisme moléculaire implique le partage d'épitopes homologues, c'est-à-dire une réactivité croisée entre un agent infectieux (les lipooligosaccharides bactériens (LOS) de *Campylobacter jejuni*) et les gangliosides (glycolipides à acides sialiques), démontré expérimentalement [14]. Ceci entraîne une réponse immune induite par l'agent infectieux, à la fois cellulaire et humorale, qui agit de manière croisée avec les composants de surface des gangliosides des nerfs périphériques [15].

Profils d'autoanticorps caractéristiques des neuropathies auto-immunes. Topographie

Les glycolipides immunodominants ou majeurs selon Quarles et Weiss [16] sont ceux qui sont les plus impliqués dans les processus auto-immunitaires du système nerveux périphérique et permettent de définir les principaux profils autoanticorps.

- Les glycolipides GM1 et GD1a impliqués dans les atteintes motrices ont une expression préférentielle sur les nerfs moteurs.
- Le ganglioside GD1b impliqué dans l'atteinte sensitive avec ataxie a une expression préférentielle sur le ganglion rachidien dorsal et les nerfs sensitifs
- Les gangliosides GT1b ou GT1a impliqués dans la paralysie bulbaire ont une expression préférentielle sur les nerfs bulbaire.
- Le glycolipide GQ1b impliqué dans l'ophtalmoplégie a une expression préférentielle sur les nerfs oculomoteurs.

Nous reviendrons plus en détail sur ces profils pour chacune des neuropathies évoquées.

Complexes anti-gangliosides (GSCs)

Des données récentes ont démontré que des anticorps provenant de quelques sérums de patients atteints de SGB réagissaient avec des complexes de gangliosides (GSCs) composés de deux gangliosides différents, mais ne réagissaient pas avec les gangliosides pris isolément [17, 18, 19]. Les gangliosides ainsi que d'autres composants lipidiques sont connus pour former des « radeaux » (lipid rafts), dans lequel deux différents gangliosides s'associent pour former un nouvel épitope conformationnel. Par exemple les complexes anticorps anti-gangliosides GD1a/GD1b et GD1b/GT1b ont été retrouvés à de graves SGB nécessitant une ventilation artificielle. En revanche, les activités de liaison des anticorps hautement spécifiques à GD1b sont fortement inhibées par l'ajout de GD1a à GD1b. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider les rôles des complexes anti-gangliosides dans la membrane plasmique et de la pertinence clinique des anticorps anti-GSCs.

2.2 Les techniques de détection des anticorps anti-gangliosides

Différentes méthodes ont été élaborées pour la recherche des auto-anticorps anti-gangliosides de classe IgG ou IgM : l'immunorévélation après chromatographie sur couche mince (CCM) [20-32], la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [20-22], la technique d'agglutination de particules [23-24], la cytométrie de flux [25], la technique d'immunodot sur membrane [26-34].

2.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice

C'est la première technique à avoir été utilisée dans ce domaine, elle fait toujours référence. Elle consiste à faire migrer les gangliosides selon leur affinité sur le gel de silice pour les séparer. Il s'agit ensuite de les incuber avec le sérum à tester puis de révéler les anticorps spécifiques fixés, par une réaction immuno-enzymatique. Malgré la grande sensibilité et spécificité de cette méthode, elle n'est pas adaptée à la pratique quotidienne en laboratoire du fait d'un temps de manipulation long (8 heures) et d'un nombre de sérums testés par série trop faible (10 à 15 maximum). Elle est encore toutefois utilisée au sein de quelques laboratoires pour la recherche et la caractérisation des autoanticorps anti-sulfoglycolipides (SGPG/SGLPG).

2.2.2 La technique d'agglutination sur latex et cytométrie de flux

Ces techniques ont été publiées [23-25] mais n'ont pas eu jusqu'ici d'application clinique puisque limitée uniquement aux anticorps anti-GM1.

2.2.3 La technique ELISA

Elle permet la mesure quantitative et qualitative d'un type d'anticorps en série. La technique ELISA est influencée par de nombreux facteurs représentés essentiellement par la nature lipidique de la molécule antigénique [35,36].

Les résultats étant exprimés sous forme de titre, il est nécessaire de déterminer un seuil de positivité par rapport à des sérums de contrôle normaux témoins (standardisation) pour limiter le plus possible les faux positifs ou faux négatifs. La fixation d'un seuil de décision clinique est difficile à établir, le test ELISA étant sans doute le plus sensible des tests disponibles mais aussi l'un des moins spécifiques.

Un seul test est aujourd'hui disponible sur le marché, fourni par le laboratoire Bühlmann. Il est employé pour le titrage des Ac anti-gangliosides majeurs comme les Ac anti-GD1b, anti-GM1, anti-GQ1b.

2.2.4 La technique d'immunodot sur membrane

Technique-maison.

La technique d'immunodot artisanale sur membrane mise au point en 1993 par l'équipe Caudie [26 et 27] présente une très bonne corrélation avec la technique de référence de CCM. Elle permet la détection simultanée de nombreuses spécificités d'auto-anticorps de classe IgG ou IgM anti-gangliosides et anti-sulfatides. La recherche d'un auto-anticorps unique n'est pas pertinente à cause des réactions croisées qui existent entre les anticorps. Cette technique est intéressante car elle permet la création de véritables profils anticorps qui se révèlent discriminants. Elle permet aussi de révéler le ou les gangliosides immunodominants au sein des profils. Toutefois, elle demande beaucoup de temps et de savoir-faire pour la préparation des réactifs et ne répond plus dans le sens des directives du GBEA (Guide de Bonne Exécution des Analyses) qui incite à l'utilisation de réactifs industriels standardisés de qualité répondant au label CE et à l'abandon des techniques artisanales très consommatrices de temps de travail.

Test d'immunodots commerciaux

Des tests de diagnostic, sous la forme de coffrets réactifs prêts à l'emploi, inspirés de la technique maison, ont été proposés pour la recherche des profils anticorps.

- Les réactifs sur membrane **Euroline Ganglioside Profil 1**® recherchant des anticorps de classe IgM et **Euroline Ganglioside Profil 2**® recherchant des anticorps de classe IgG sont commercialisés par Euroimmun® et vendus en France par Bio-Advance® pour la détection de 7 anticorps anti-gangliosides.
- Le test **Dotzen Zentec**® Ganglio Profile Ab® est commercialisé par Ingen®. Le réactif a été expertisé par l'équipe lyonnaise du Dr. C.Caudie en 2006 [32] puis réévalué ensuite par cette autre étude expérimentale.
- Le réactif sur membrane Enzyme Immunodot de **Generic Assays**®, commercialisé par Labodia® est le plus récent. Il permet la détermination d'anticorps de classe IgG et IgM dirigés contre 11 anti-gangliosides. Il a également été expertisé par le professeur RL Humbel [33] puis de nouveau par le docteur C.Caudie en 2010 [34] et enfin par cette dernière étude.

Ces tests sont inscrits à la nomenclature de Montpellier depuis 2009. La cotation est BHN 150 pour chacune des deux classes d'autoanticorps anti-gangliosides.

Les performances analytiques : praticabilité, reproductibilité ainsi que les performances diagnostiques : sensibilité, spécificité de chacun de ces tests ont été étudiées ; ce travail a fait l'objet de mon rapport de stage hospitalier puis de ma thèse. Nous y reviendrons dans la deuxième partie de cette thèse.

2.3 Neuropathies périphériques associées aux anticorps anti-gangliosides

Les anticorps anti-gangliosides présentent un intérêt diagnostique dans deux grands types de neuropathies périphériques :

- **2.3.1** Les polyradiculonévrites aiguës PRNA ou syndrome de Guillain-Barré et formes cliniques variantes associées
- **2.3.2** Les neuropathies périphériques auto-immunes chroniques

a) NMMBC : Neuropathie Motrice Multifocale avec Blocs de Conduction Persistants

b) Les neuropathies périphériques associées à une IgM monoclonale

- Les neuropathies périphériques à IgM monoclonale à activité anti-MAG
- Les neuropathies périphériques à activité anti-gangliosides :
 - GM1.
 - gangliosides disialylés : CANOMAD.

2.3.1 Les polyradiculonévrites aiguës ou syndrome de Guillain-Barré :

Les polyradiculonévrites aiguës (PRNA) sont regroupées traditionnellement sous le terme général de syndrome de Guillain-Barré (SGB).

Les PRNA constituent la cause la plus fréquente de paralysies aiguës par atteinte neuromusculaire dans les pays occidentaux depuis la disparition de la poliomyélite [37 et 38]

- **Historique**

C'est en 1859 que Jean Landry, médecin français décrit pour la première fois en détail les symptômes de la maladie : « trouble nerveux paralysant les jambes, les bras et les muscles respiratoires ». En 1891 Quincke apporte une preuve biologique en réalisant un prélèvement du LCR mais ce n'est qu'en 1916 que trois médecins parisiens, Georges Guillain, Jean Alexandre Barré et André Strohl mettent en évidence l'anomalie caractéristique : une augmentation des protéines au niveau du liquide céphalo-rachidien (hyperprotéinorachie) associée à une numération normale des cellules chez deux soldats touchés par une paralysie généralisée transitoire.

- **Définition et épidémiologie**

Le syndrome de Guillain-Barré (SGB) est une polyradiculonévrite aiguë inflammatoire faisant partie du cercle plus large des neuropathies périphériques ou polyneuropathies. Le syndrome de Guillain Barré est la principale cause de paralysie aiguë par atteinte neuromusculaire dans les pays occidentaux depuis la disparition de la poliomyélite. Son incidence reste faible : entre 2 et 3 pour 100 000 habitants [39,40]. On estime qu'en France 1 700 patients sont hospitalisés chaque année pour un syndrome de Guillain-Barré [37]. Il atteint les deux sexes, tous les âges et toutes les ethnies. Cependant, dans les grandes séries, une modeste mais constante prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,5 en moyenne, est observée et l'âge moyen est d'environ 40 ans [3, 41].

- **Etiologie**

Dans la grande majorité des cas de PRNA la cause ou l'origine de la maladie n'est pas connue ou pas recherchée. Cependant pour les formes les plus graves, on constate qu'il s'agit de maladies post-infectieuses. Dans les deux tiers des cas de ces PRNA post-infectieuses, une maladie virale ou bactérienne déclenchante est identifiée, généralement une infection respiratoire ou gastro-intestinale qui a guéri quand débute les symptômes neuropathiques. Dans la littérature [15, 31, 42-44], on identifie sérologiquement plusieurs agents infectieux suspectés d'avoir été le facteur déclenchant dans différents cas de SGB : *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, Cytomégalovirus (CMV), virus d'Epstein-Barr (EBV), virus varicelle-zona (VZV), virus de l'herpès humain (HHV), le virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et enfin le virus de la grippe avec une incidence très faible, de 4 à 7 cas pour 100.000 sujets grippés [45]. *C. jejuni* reste le plus étudié et le mieux connu des agents infectieux suspectés.

- **Clinique**

D'une manière variable et d'un individu à l'autre, le SGB se traduit par un déficit sensitivomoteur bilatéral, symétrique et extensif. Il atteint les nerfs permettant de percevoir les sensations (chaleur, froid, etc.) ainsi que ceux commandant les mouvements musculaires pour marcher, respirer, avaler, parler.

La faiblesse musculaire est le symptôme initial le plus fréquemment retrouvé ; elle débute à la partie proximale des membres et suit une extension ascendante. Une quadriparésie flasque prédominante aux membres inférieurs est observée lors de la première consultation. Associées à ces signes moteurs, on retrouve des paresthésies (sensations réduites, engourdissements, des fourmillements aux extrémités). Les réflexes ostéotendineux sont diminués ou abolis. Fréquemment, il existe une accélération du pouls (tachycardie), une hypertension artérielle

Asbury et ses collaborateurs ont proposé en 1978 puis 1990 [46], une définition du SGB avec :

- les critères nécessaires au diagnostic : un déficit moteur progressif et une aréflexie progressant en moins de 4 semaines.

- les critères en faveur du diagnostic : une progression en 2 semaines, une symétrie, des troubles sensitifs, une atteinte des nerfs crâniens, une dysautonomie, une protéinorachie élevée des anomalies électrophysiologiques et une régression en 2 à 4 semaines.

- les critères douteux quand il existe une asymétrie, des troubles sphinctériens, une pléiocytose dans le liquide céphalorachidien.

La chronologie de la maladie comporte 3 phases : une phase d'extension, comprise entre le premier signe déficitaire et le maximum des paralysies (douzaine de jours), une phase de plateau qui s'achève au premier signe de récupération motrice (de quelques jours à plusieurs semaines selon la sévérité du déficit neurologique) et une phase de récupération d'une durée variable de 3 à 6 mois et plus.

L'évolution du SGB en fait une maladie importante tant au niveau social qu'économique.

En effet, le taux de mortalité même avec les techniques modernes de réanimation, varie entre 5 et 10% et l'évolution vers une forme invalidante (incapacité de marcher 1 an après) s'observe dans 10 à 15% des cas avec des grandes variations selon les formes cliniques (lire précédemment). Le SGB doit donc être considéré comme une urgence en raison de son évolution imprévisible vers une forme sévère par atteintes des nerfs bulbaires ou des muscles respiratoires.

- **Formes cliniques**

Les polyradiculonévrites aiguës peuvent être individualisées en cinq entités immunocliniques caractéristiques bien distinctes. Il convient de bien distinguer les formes avec démyélinisation aux formes purement axonales [37] :

- 1. La polyradiculoneuropathie aiguë démyélinisante (AIDP)**

Cette forme connue sous le nom d'AIDP (Acute Inflammatory Demyelinating polyneuropathy) est la forme la plus fréquente du SGB en Europe et Amérique du Nord principalement. Elle se caractérise par une démyélinisation par dissociation segmentaire de la myéline qui affecte la transmission nerveuse électrique, entraînant des blocs de conduction et une paralysie flasque. Des lésions axonales peuvent aussi survenir secondairement, mais il y a par contre peu de troubles sensitifs. Une régression rapide et plus ou moins complète des paralysies (sauf en cas d'atteinte axonale) s'en suit. Une fois les réactions immunitaires arrêtées, la régénérescence et la remyélinisation débutent.

- 2. La forme motrice axonale : AMAN (Acute Motor Axonal Neuropathy)**

Ce type de neuropathie est particulièrement fréquent en Chine rurale, au Japon et au Mexique touchant les enfants et les jeunes adultes. Il se traduit par une atteinte axonale purement motrice pouvant aller jusqu'à une désintégration totale et étendue, en fonction de la vigueur

des réponses immunes. La vitesse de récupération dépend de l'intensité des lésions. Si l'évolution est assez favorable chez l'enfant, elle l'est beaucoup moins chez l'adulte chez qui de très graves séquelles peuvent subsister.

3. La forme sensitivomotrice axonale : AMSAN (Acute Motor Sensory Axonal Neuropathy)

La forme AMSAN se caractérise par une attaque primitive des axones moteurs et sensitifs. Des paralysies diffuses et très sévères, pouvant nécessiter une assistance respiratoire, surviennent quelques jours (« début fulminant ») après le début des symptômes neurologiques. On constate une amyotrophie sévère et des déficits sensitifs graves. Il y a peu ou pas de démyélinisation. La récupération est retardée et très incomplète.

4. La forme SMF (Syndrome de Miller-Fisher)

Il existe de nombreuses variantes du SMF. Le SMF représente environ 5% des cas de SGB. Les symptômes se traduisent classiquement par la triade : ataxie, aréflexie ostéotendineuse et ophtalmoplégie. L'évolution est en général favorable.

5. La forme bulbaire ou oculo-pharyngo-cervico-brachiale

Cette forme représente environ 2% des SGB. Les signes cliniques se traduisent par une dysphagie, puis une diplégie et une paralysie des membres supérieurs alors que les membres inférieurs sont relativement épargnés.

• Profils autoanticorps anti-gangliosides rencontrés.

-Le profil **IgG anti-GM1** et apparentés est associé au SGB moteur axonal pur (AMAN/NMAA : neuropathie motrice axonale aiguë dans 70 à 75% des cas)

-Le profil **IgG anti-GD1a** est associé au SGB sensitivomoteur axonal sévère (AMSAN) dans 70 à 75%.

-Le profil **IgG anti-GQ1b et GT1a** et gangliosides apparentés est très majoritairement associé au syndrome de Miller Fisher typique (SMF) (profil observé chez plus de 90% des SMF).

Le **profil IgG anti-GT1a** est associé au SGB bulbaire.

-Le profil **IgG anti-GD1b** et gangliosides apparentés est associé au SGB de forme sensitive pure avec ataxie (perte de coordination des mouvements volontaires), forme assez rare 2 à 4%.

-Le profil **IgM anti-GM2** est associé au SGB de forme sévère faisant suite à une infection récente par le CMV.

En raison des similarités structurelles entre les gangliosides GM1 et certains épitopes présents à la surface de divers microorganismes, la présence d'IgM anti-GM1 peut être observée de manière éphémère, dans le sérum d'individus sains. Une observation ponctuelle d'IgM anti-GM1 n'est donc pas pathognomonique d'une neuropathie. En effet, dans la population générale, on retrouve des IgM anti-GM1 et GD1b dans 10 à 15% des cas à des taux modérés.

NB : Il est aussi à noter que dans le SGB « classique », on retrouve des IgM anti-GM1 et GD1b dans 10 à 15% des cas à taux modérés. La confusion reste donc possible.

- **Thérapeutique**

Deux options sont possibles ; la plasmaphérèse et les immunoglobulines polyvalentes intraveineuses, cette dernière représentant une des thérapeutiques essentielles du SGB.

La plasmaphérèse

Elle consiste en des échanges ou soustractions plasmatiques. Elle est utilisée dans les cas graves du SGB. Cette technique requiert un équipement spécial qui n'est disponible que dans de grands hôpitaux et centres médicaux.

Les immunoglobulines polyvalentes intraveineuses Ig IV

Les Ig IV sont des préparations thérapeutiques d'IgG humaines normales, intactes et fonctionnelles, obtenues à partir d'un mélange de plasmas provenant de plus de 1000 patients sains. C'est le traitement le plus utilisé car le plus facile à réaliser : absence de nécessité d'un équipement spécialisé et de personnel qualifié. Le protocole thérapeutique généralement pratiqué est le suivant : Ig IV (Tegeline® produit par LFB) à 0.4g/kg/j pendant 5 jours.

Les deux mécanismes d'action principaux supposés des Ig IV au cours du SGB sont la neutralisation des AutoAc présents dans le sérum des patients et la remyélinisation. D'autres mécanismes, en particulier la modulation de la production de cytokines, pourraient probablement jouer un rôle.

- **2.3.2 Les neuropathies périphériques auto-immunes chroniques :**

a) NMMBC : neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction persistants.

En 1982, Lewis et al. [47] ont individualisé, au sein des polyradiculonévrites chroniques idiopathiques inflammatoires (Chronic Inflammatory demyelinating polyneuropathy : CIDP) un sous-groupe de neuropathies sensitivomotrices chroniques présentant des blocs de conduction persistants.

D'après Vallat et Léger [3], les NMMBC constituent une entité nosologique définie, décrite pour la première fois en 1985 par Parry et Clarke [48]. Les travaux du groupe de Pestronk [49] ont achevé de définir cette maladie en soulignant la fréquence de la présence d'anticorps sériques dirigés contre le ganglioside GM1 et la sensibilité aux immunoglobulines humaines pour administration par voie intraveineuse (IgIV).

La prévalence est mal connue mais estimée approximativement à 1 à 2 pour 100 000. [3]. La maladie survient principalement entre 30 et 50 ans. Les caractéristiques cliniques sont une prédominance masculine : (3H/1F), se caractérisant par un déficit moteur asymétrique prédominant aux membres supérieurs, souvent associé à des crampes et à des fasciculations (contraction involontaire et isolée d'un faisceau musculaire) et pouvant aboutir à une amyotrophie, à l'instar de la SLA : sclérose latérale amyotrophique. Il n'y a toutefois pas d'atteinte des nerfs crâniens ni de déficit respiratoire ni aucun déficit sensitif objectif. L'évolution est lente et progressive.

Le recours à l'EMG est capital pour mettre en évidence la présence de blocs de conduction.

En l'absence de blocs de conduction caractérisés, on peut s'aider de la présence d'autres anomalies de la conduction motrices : allongement modéré des latences distales motrices (LD) et diminution légère des vitesses de conduction motrices (VCM).

Lorsqu'il existe un doute clinique avec différentes formes de polyradiculonévrites chroniques PRNC, les examens biologiques peuvent parfois aider à poser le diagnostic. Ainsi, une protéinorachie normale (<0.4g/l) permet de faire la différenciation avec les autres PRNC.

Les caractéristiques immunologiques sont la présence d'autoanticorps sériques de classe IgM anti-gangliosides GM1 et apparentés dans 60% des cas, à des taux significatifs [51].

Les principaux profils décrits sont :

-IgM anti-GM1

-IgM anti-GM1 et GD1b

-IgM anti GM1, GD1b et GM2

Les traitements font appel aux immunoglobulines polyvalentes intraveineuses à fortes doses dont l'efficacité est remarquable à court terme dans 70 à 80% des cas [3].

L'évolution est lentement progressive avec une aggravation en poussée possible. Bien que le pronostic vital ne soit pas en jeu, il existe un handicap fonctionnel à long terme.

b) Les neuropathies chroniques associées à une IgM monoclonale

Les neuropathies périphériques associées à une gammopathie monoclonale ou paraprotéine sont difficiles à classer du fait de leur hétérogénéité clinique, électrophysiologique, neuropathologique, hématologique mais également du fait de l'hétérogénéité de la classe, de l'immunoréactivité et de la pathogénicité de l'immunoglobuline monoclonale associée.

Pour rappel, une immunoglobuline monoclonale IgM est caractérisée par la présence dans le sang et/ou les urines d'une Ig d'un même type immunochimique, IgM-kappa ou IgM-lambda en quantité anormalement élevée, témoignant d'une prolifération lympho-plasmocytaire monoclonale. Un grand nombre d'IgM monoclonales malignes ou le plus souvent dites bénignes ont une activité autoanticorps contre les glycoconjugués du nerf périphérique : MAG/SGPG d'une part et gangliosides d'autre part.

- **Neuropathie périphérique à activité anti-MAG**

La neuropathie démyélinisante avec activité anti-MAG est la plus fréquente des neuropathies associées à une dysglobulinémie monoclonale de type IgM. Elle représente 50% à 60% des cas. En 1980, Latov et al, mettent en évidence l'activité autoanticorps d'une IgM dirigée contre un glycoconjugué de la myéline. Ce glycoconjugué a été identifié comme la MAG (Braun et al; 1982[52], Steck et al; 1983 [53]). La présence d'autoanticorps IgM anti-MAG est toujours associée à une gammopathie monoclonale de classe IgM, le plus souvent il s'agit d'une forme MGUS « monoclonal gammopathy of undetermined significance », plus rarement d'une maladie de Waldenström ou d'un lymphome non hodgkinien. Cette forme de neuropathie est plus fréquemment rencontrée chez l'homme entre 40 et 70 ans. La clinique est caractérisée par une polyneuropathie distale sensitivo-motrice à prédominance sensitive et ataxiante. Les troubles sensitifs débutent souvent aux membres inférieurs, cependant l'atteinte initiale des membres supérieurs reste possible. L'hypoesthésie distale, l'aréflexie ainsi qu'un tremblement postural prédominant aux membres supérieurs sont souvent constatés. Il s'agit d'une forme chronique, lentement progressive, démyélinisante souvent accompagnée d'une dégénérescence axonale.

- **Neuropathies périphériques associés à une IgM monoclonale à activité anti-gangliosides**

Les IgM monoclonale à activité dominante anti-GM1

Ce sont des neuropathies à prédominance motrice. L'atteinte est myélinique dans les formes débutantes puis axonales dans les formes anciennes [54].

Les IgM monoclonale à activité anti-gangliosides disialylés : CANOMAD

Ce sont des neuropathies sensitives ataxiantes (**SAN : Sensitive Ataxic Neuropathy**) avec peu ou pas de déficit moteur, souvent sévères et d'évolution assez rapide. Une paralysie oculomotrice et des troubles bulbaires sont fréquemment associés, la neuropathie pouvant alors être comparée à une forme chronique de Miller-Fisher.

Ce tableau a été pour la première fois décrit en 1985 par Ilyas et Coll [21] et appelé en 1996 par l'équipe de Willison : **CANOMAD**, acronyme désignant « **C**hronic **A**taxia **N**europhathy **O**phthamoplegia, **I**gM paraprotein, cold **A**gglutinins, **D**isialosyl antibodies) [11].

Le tableau clinique est typiquement sensitif pur avec ataxie par atteintes des longues fibres myélinisées. Il y a préservation relative de la forme motrice des membres. L'évolution clinique est chronique, s'étendant sur une période de 10 ans, entrecoupée d'épisodes de rechutes. Le tableau clinique complet CANOMAD est rare et il existe de nombreuses variantes cliniques.

Le critère d'inclusion des patients dans le registre national des CANOMAD syndromes mise en place par la Société Française de Neurologie, est la présence spécifique du profil autoanticorps anti-gangliosides disialylés de classe IgM.

La présence d'anticorps anti-gangliosides disialylés apparaît être la signature de ce syndrome [55,56].

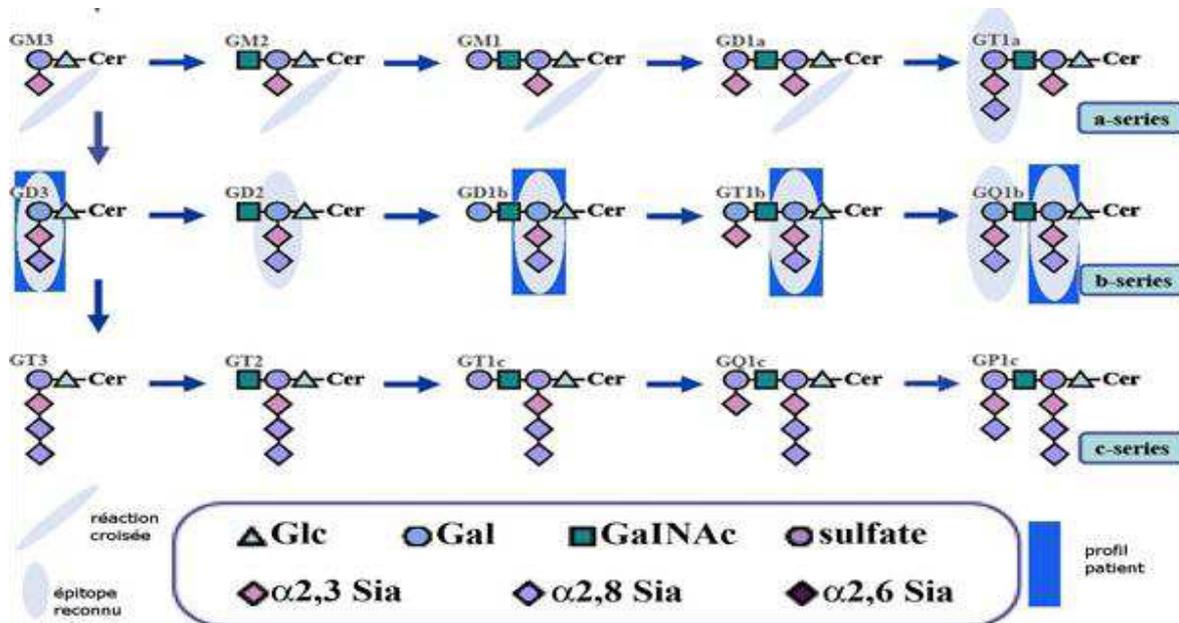


Figure 3 : Les gangliosides impliqués dans le syndrome CANOMAD selon Yoshikawa

Les options thérapeutiques sont relativement peu nombreuses pour les neuropathies associées à une gammopathie monoclonale. Le traitement de l'hémopathie sous-jacente permet de traiter la neuropathie : Il s'agit pour les formes d'hémopathies malignes, de traitement de chimiothérapie [5].

Pour les gammopathies monoclonales anciennement appelées bénignes, l'arsenal thérapeutique est représenté par les traitements immunomodulateurs à base de corticoïdes, d'IgIV, d'échanges plasmatiques ou encore plus récemment de thérapies ciblées anti-CD20 (cluster de différenciation présent sur les lymphocytes B notamment ceux responsables de la sécrétion de l'immunoglobuline monoclonale incriminée dans la neuropathie).

En ce qui concerne le syndrome CANOMAD, ce sont les Immunoglobulines IV les plus utilisées, le rituximab reste donc en seconde ligne thérapeutique. Les échanges plasmatiques (EP) ne sont que peu utilisés. Pour les formes avec hémopathie maligne, la chimiothérapie ou l'autogreffe traitant l'hémopathie complètent le traitement.

La thérapie ciblée anti-CD20 occupe selon la SNFMI (société nationale française de médecine interne) et l'EFNS PNS (European Foundation of Neurological Societies / Peripheral Nerve Society) une place en seconde ligne thérapeutique pour les neuropathies dysimmunes à IgM après les Ig IV et les EP en première ligne [5].

PARTIE 2 : TRAVAIL PERSONNEL

Notre travail au sein du laboratoire d'auto-immunité du système nerveux périphérique du Centre de Biologie et Pathologie Est et Centre de Biologie Sud a consisté en l'identification des profils anticorps anti-gangliosides par les différents tests commerciaux.

Les étapes ont été :

- 1) Sélectionner les sérums avec des profils anticorps anti-gangliosides hautement spécifiques d'un type de neuropathie, identifiés dans le laboratoire par la technique d'immunodot maison puis Generic Assays parmi tous les profils anticorps.
- 2) Identifier et décrire les différents anticorps anti-gangliosides présents dans les profils spécifiques.
- 3) Evaluer les performances analytiques et diagnostiques de chacun des tests.
- 4) Comparer nos résultats à ceux déjà existants dans la littérature.
- 5) Révéler l'activité monoclonale de l'IgM vis-à-vis des gangliosides disialylés dans le cadre du diagnostic des CANOMAD syndromes.

Ce travail a été présenté sous forme de poster lors du 10^e symposium international d'auto-immunité de Dresde du 22 au 25 septembre 2011 : « Multiparametric detection of anti-ganglioside antibodies by comparing a routine in-house immunodot with 5 commercial immunoassays in patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies » (**annexe**).

Un article a été soumis pour publication à la revue Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) : « Commercial tests for detecting multiple anti-ganglioside autoantibodies in patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies (**annexe**) ».

1 Matériel et méthodes

1.1 Les sérums de patients : critères de sélection

Nous avons travaillé à partir de sérums de patients congelés à -20°C, préalablement analysés dans le laboratoire sur la période 2002 à 2010 dans le cadre du diagnostic d'une neuropathie périphérique auto-immune. Le bilan anticorps anti-nerfs comportait une recherche des anticorps anti-gangliosides par la technique d'immunodot maison, une recherche des anticorps anti-myéline par immunofluorescence, un dosage des anticorps anti-MAG par ELISA, une recherche des anticorps anti-SGPG/SGLPG par chromatographie en couche mince (CCM).

Nous avons sélectionné les sérums présentant des profils autoanticorps caractéristiques fortement positifs d'un type de neuropathie, de classe IgG ou de classe IgM. Nous les avons aliquotés, codés et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour la recherche des autoanticorps anti-gangliosides par les 4 techniques à évaluer.

Les sérums retenus sont des sérums présentant une forte positivité par la technique d'immunodot maison en anticorps anti-gangliosides dans le but de les diluer dans un deuxième temps pour évaluer la sensibilité des réactifs à identifier les profils anticorps anti-gangliosides caractéristiques. Des sérums séronégatifs de neuropathies périphériques ont également été sélectionnés pour juger de la spécificité.

1.2 La technique d'immunodot maison de dépistage des autoanticorps anti-gangliosides

Il s'agit d'une technique d'immunodot blot sur membrane de PVDF développée par Chabraoui et al en 1993, optimisée et simplifiée depuis dans le laboratoire [26-27].

Elle permet la détection simultanée des autoanticorps anti-sulfatides et anti-gangliosides de classe IgG et IgM correspondant aux spécificités GM3, GM2, GM1, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b.

Les gangliosides d'origine bovine sont déposés sur la membrane selon leur distribution chromatographique. Ceci permet de comparer facilement les profils obtenus avec ceux de la technique de référence de chromatographie en couche mince. L'immunodot sur membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride) a été optimisée à la température de +4 à +8°C.

Les gangliosides utilisés sont les gangliosides bovins purifiés à plus de 99% de Sigma ou Calbiochem en fonction de la disponibilité du marché. Les sulfatides Sigma sont également testés en systématique.

Il est préparé 2 bandelettes pour chaque sérum de patient, à savoir le dépôt en goutte de 1µL de chacun des gangliosides à la concentration de 1µg. Les sulfatides sont déposés à la concentration de 0.2µg. Les bandelettes sont préparées à l'avance et peuvent être conservées à +4°C en milieu sec pendant un mois avant utilisation.

Les sérums des patients et les contrôles sont testés en systématique à la dilution de travail de 1/100. L'incubation de 120 minutes se fait à froid sous agitation.

L'anticorps révélateur utilisé, les fractions F(ab')² d'un sérum de chèvre anti-IgM et anti-IgG humaines, couplées à la phosphatase alcaline PAL (Jackson Immuno Research/Interchim) sont incubées 90 minutes avec agitation et à froid.

La révélation de l'enzyme par le substrat Sigma fast tablets NBT/BCIP (nitrobleu de tétrazolium en tampon bromo-chloro-indolyl-phosphate) est de 30 minutes à 25-27°C. Les résultats dans le cadre du dépistage sont exprimés en croix en fonction de l'intensité de coloration des spots : + : positif faible, ++ : positif, +++ positif fort. Le titre lorsqu'il s'impose dans le cadre du suivi des patients après traitement, est exprimé par l'inverse de la dernière dilution donnant un spot visible.

Tout sérum positif est ensuite testé avec les immuns sérums de chèvre anti-kappa et anti-lambda, eux aussi marqués à la PAL pour rechercher une activité IgM monoclonale.

La révélation est effectuée par le substrat NBT/BCIP. Tout sérum positif apparaît sous la forme d'un ou plusieurs spots colorés correspondant à un ou plusieurs anticorps anti-gangliosides et/ou anti-sulfatides.

Cette technique a été utilisée en routine au laboratoire de 1993 à 2010.

Elle présente une bonne reproductibilité et a permis l'établissement de profils spécifiques et caractéristiques de neuropathies auto immunes. Elle nous a permis de jouer le rôle de technique de comparaison dans ce travail.

1.3 Les techniques de dépistage des autoanticorps anti-gangliosides par les tests diagnostiques.

1.3.1 Le test Ganglio Profile Dotzen (lot testé : L ZA-27-1026C exp 08/11)

Le test Dotzen Ganglio Profile Ab d'immunodot sur membrane est commercialisé par Ingen France. Il permet la détection simultanée de 9 anticorps anti-gangliosides GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b et des anti-sulfatides.

Le dépistage se déroule en deux temps. Le premier temps est le dépistage des autoanticorps, le deuxième temps, en cas de positivité, est la caractérisation de la classe IgG et/ou IgM des

autoanticorps impliqués. Les bandelettes de membrane contenant les différents glycolipides adsorbés sous la forme de microgouttes, sont incubées 10 minutes dans un 1mL de tampon avant addition de 250 µL de sérum de patients dilué au 1/100.

Après 3 lavages de 5 minutes, les bandelettes sont incubées à froid avec l'immunsérum anti-immunoglobulines humaines, marqué à la peroxydase pendant 60 minutes. Après trois lavages de 5 minutes et un rinçage dans l'eau désionisée, les bandelettes sont incubées 10 minutes dans la solution de substrat chromogène, le tétraméthylbenzidine. La réaction est stoppée par un lavage de 5 minutes dans l'eau. Les bandelettes sont séchées à l'air libre sur un papier absorbant avant d'être lues à l'aide d'une grille d'identification. La présence des auto-anticorps se traduit par des spots de coloration bleue, d'intensité variable. Les spots les plus colorés sont immunodominants. Sur chaque bandelette, un spot de contrôle du bon déroulement de la réaction immunologique est inclus.

1.3.2 Le test Euroimmun (lots testés D11 01 03 AB/ D11 03 AC exp 02/01/12)

Le test Euroline anti-ganglioside profil 1(IgG) ou 2 (IgM) d'Euroimmun et commercialisé par Bioadvance, depuis 2005, est une technique d'immunodot sur membrane permettant d'établir par détermination qualitative, un profil autoanticorps IgG et/ou IgM vis-à-vis de 7 gangliosides fixés sur la membrane. Ce sont les gangliosides purifiés GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b et GQ1b.

Les sérums de patients dilués (1/51^{ème}) sont incubés pendant 60 minutes à température ambiante (25°C) avec agitation. Après lavages avec un tampon, les bandelettes sont incubées avec une solution de conjugué d'enzyme (IgG ou IgM anti-humaines (chèvre) marquées à la phosphatase alcaline) pendant 60 minutes à température ambiante avec agitation.

Après lavage, la révélation se fait par incubation de la solution de substrat de NBT/BCIT pendant 10 minutes à +25°C sous agitation. Après arrêt de la réaction par rinçage à l'eau distillée, on procède à l'analyse visuelle des bandes colorées.

Sur le bas de la bandelette, il y existe une bande contrôle « de fonction » qui doit confirmer que l'incubation ait été correctement réalisée par l'apparition d'une forte réaction colorée. L'absence de bandes colorées signifie que le sérum est négatif, une bande très faible, un résultat non significatif, une bande nette et forte, un sérum positif, et une bande très fortement colorée, d'une intensité comparable à la bande témoin, signifie que le sérum est très positif.

La lecture et le rendu des résultats sont réalisés grâce au logiciel Bioadvance Euroline Scan qui, couplé à un scanner de bureau permet la numérisation et l'analyse des profils.

1.3.3 Le test Generic Assays (lot 10 5003 15S/1 exp 31/07/11)

C'est une technique d'immunodot sur membrane, aussi appelée line immunoassay (LIA) commercialisée par Labodia France. Les antigènes sont déposés sous forme de lignes. Il permet la recherche simultanée des autoanticorps de classe IgG et/ou IgM anti-sulfatides et anti-gangliosides de 11 spécificités dans l'ordre suivant : sulfatides, GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b.

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Chaque bandelette comporte les 12 antigènes d'origine humaine déposés en ligne sur la membrane plus une ligne de contrôle de réactivité.

L'incubation des bandelettes se fait dans un plateau d'incubation à 10 canaux. Les différents sérums de patients déposés sous un volume de 10µL dans 1ml tampon sont incubés 120 minutes à +4°C sous agitation (dilution 1/100).

Après un lavage de 5 minutes avec le tampon, les bandelettes sont incubées 60 minutes à +4°C avec 50 µL d'immunsérum anti-globuline IgM ou IgG ou IgG+IgM marqué à la peroxydase (conjugué). Après lavage de 5 minutes avec le tampon, les bandelettes sont incubées 10 minutes dans la solution de substrat chromogène de tetraméthylbenzidine à la température ambiante. La réaction est stoppée par un lavage avec le tampon pendant 2 minutes puis par un 2^{ème} lavage dans de l'eau distillée. Les bandelettes sont séchées. Un échantillon est considéré comme positif si une ou plusieurs des lignes correspondant aux gangliosides sont visibles.

La lecture des profils se fait après séchage complet des bandelettes sur la feuille de résultats.

L'intensité des différentes bandes sur le profil est comparée à l'intensité des bandes de la bandelette témoin présente dans chaque coffret (Lot : P708).

1.3.4 Le test GanglioCombi Bühlmann (lot 3691 N.GM exp 31.03.12)

Le test GanglioCombi ELISA des laboratoires Bühlmann est basé sur une méthode immunométrique de type « sandwich » amplifiée par une réaction enzymatique. Les gangliosides asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b ont été coatés sur une microplaque. Les échantillons sériques à tester ainsi que les contrôles sont incubés dans la microplaque durant 2 heures. Les auto-anticorps anti-gangliosides présents sont liés aux gangliosides coatés. Après l'élimination par lavage des molécules non liées, des anticorps dirigés contre les IgG et/ou IgM, conjugués à la peroxydase de Raifort (HRP) viennent se fixer aux puits. La microplaque est ensuite incubée une nouvelle fois durant 2 heures. Après un second lavage, pour éliminer les anticorps marqués non liés, le substrat TBM (tétraméthylbenzidine) est ajouté. Il induit une coloration bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-gangliosides initialement liés. La réaction de coloration est arrêtée par l'ajout d'une solution-stop acide qui fait passer la couleur du bleu au jaune. L'intensité de la coloration est déterminée par la mesure de l'absorbance à 450 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-gangliosides présents dans les échantillons. Les taux d'anticorps anti-gangliosides sont exprimés en rapport à un contrôle de référence (contrôle élevé), pool de différents échantillons sériques humains testés positifs pour les auto-anticorps anti-GM1.

Deux cut-off à 30 % (zone grise) et 50% (positivité) ont été déterminés par le fabricant à la suite des travaux réalisés par D.Taravel [41].

2 Résultats

2.1 Les sérums testés avec titres importants en anticorps anti-gangliosides

Nous avons sélectionné 12 sérums de variants immunocliniques de syndromes de Guillain-Barré (SGB) présentant un profil caractéristique de classe IgG :

- 5 profils IgG anti-GM1, GD1b de SGB moteurs et axonaux suite à une infection par le *Campylobacter jejuni* (patients SAP, GAB, ANO, POO, MAO)
- 1 profil IgG anti-GD1a, GT1a, GQ1b d'un SGB moteur axonal sévère (patient ROZ)
- 1 profil IgG anti-GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b d'un SGB avec ophtalmoplégie (patient BAL)
- 1 profil IgG anti-GT1a dans un SGB moteur pur avec paralysie bulbaire très sévère (patient ROU)
- 4 profils IgG anti-GT1a et GQ1b dans un SMF (patients SEV, BOU, PUG, OCA)

Nous avons sélectionné 21 sérums de patients présentant un profil caractéristique de classe IgM :

- 12 sérums présentant un profil caractéristique d'un CANOMAD syndrome avec une IgM monoclonale à forte activité anti-gangliosides disialylés : GD1b, GD3, GT1b, GQ1b (patients BRI, BRU, BUR, CHA, COE, DEG, GAR, LAL, MAN, MAI, RAV, VER.)
- 3 profils IgM monoclonale à forte activité anti-GM1 et GD1b (patients RON, BAU, BAR) dans une neuropathie périphérique chronique motrice pure.
- 1 profil avec une IgM monoclonale à forte activité anti-GD1a et GT1b (patient ROS).
- 2 profils avec des anticorps IgM anti-GM2 dans un SGB démyélinisant sensitif suite à une infection par le CMV (patients NIC, CHO)
- 1 profil avec des anticorps IgM anti-sulfatides >GD1b> GM1 chez un patient présentant une neuropathie périphérique chronique associée à une IgM monoclonale (patient FOR).
- 1 profil à activité anti-GM1>GD1b dans une neuropathie multifocale motrice avec bloc de conduction (patient MES).
- 1 profil avec des anticorps IgM et des IgG anti-GM1 et GD1b chez un patient présentant un SGB moteur axonal (patient SAP)

Nous présentons dans le **tableau 2** pour chaque neuropathie périphérique les profils anti-gangliosides obtenus par la technique maison.

Tableau 2 : Profils anti-gangliosides obtenus par la technique maison pour chaque neuropathie

Immune-mediated peripheral neuropathies	Number of samples	Anti-ganglioside autoantibody profiles detected by in-house immunodot
AMAN and AMSAN	6	IgG antibodies against GM1>GD1b
Miller Fisher syndrome	4	IgG antibodies against GQ1b
SGB with ophthalmoplegia	1	IgG from GBS with antibodies against GD1a, GQ1b
SGB with ophthalmoplegia	1	IgG from GBS with antibodies against GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b
Chronic sensory neuropathy	1	M-IgM antibodies against sulfatides>GD1b>GM1
CANOMAD syndrome	12	M-IgM antibodies against GD1b, GD3, GT1b, GQ1b
Chronic motor neuropathy	3	M-IgM antibodies against GM1>GD1b
Chronic motor neuropathy	1	M-IgM antibodies against GD1a and GT1b
MMN	1	IgM antibodies against GM1>GD1b
CMV infected GBS patients	2	IgM antibodies against GM2
Axonal motor GBS	1	IgM and IgG antibodies against GM1>GD1b

Nous avons également **sélectionné 10 sérums de patients séronégatifs** pour les anticorps anti-gangliosides.

Nous avons sélectionné **2 sérums de contrôle du laboratoire**, sérums de patients fortement positifs :

Ces 2 sérums sont utilisés dans chaque série de l'étude d'évaluation :

- un sérum de contrôle avec des anticorps de classe IgM anti-gangliosides disialylés de type CANOMAD (patient MAI).
- un sérum avec des anticorps anti-GM1 et GD1b classe IgG et IgM correspondant à un SGB moteur axonal hospitalisé en service de réanimation (patient SAP).
- Ces sérums ont été titrés en dilutions limites.

2.2- Performances analytiques des 4 tests diagnostiques

2.2.1 Praticabilité des coffrets testés

Nous résumons dans le **tableau 3** les principales caractéristiques des différents tests avec les protocoles opératoires selon les notices des fabricants.

Tableau 3 : Caractéristiques analytiques des tests comparés à celles de la technique maison

	Technique maison	Test 1 Generic Assays dot-line	Test 2 Zentec dot-spot	Test 3 Euroimmun dot-line	Test 4 Bühlmann ELISA
Support	membrane	membrane	membrane	membrane	ELISA microplate
Gangliosides	8	11	9	7	5
Sulfatide	yes	yes	yes	no	no
Asialo GM1	no	no	no	no	yes
Galacto-cerebroside	yes	no	no	no	no
Spectrum of glycolipids	GM1 GM2 GM3 GD3 GD1a GD1b GT1b GQ1b	GM1 GM2 GM3 GM4 GD1a GD1b GD2 GD3 GT1a GT1b GQ1b	GM1 GM2 GM3 GD3 GD1a GD1b GT1a GT1b GQ1b	GM1 GM2 GM3 GD1a GD1b GT1b GQ1b	GM1 GM2 GD1a GD1b GQ1b
Final sera dilution	1/100	1/101	1/501	1/51	1/50
Temperature	+ 4 °C	+ 4 °C	+ 4 °C	RT	+ 4 °C
Serum incubation (h)	2	2	2	1	2
Conjugate incubation (h)	1.5	1	1	1	2
Conjugate label	Alkaline phosphatase	Horseradish peroxydase	Horseradish peroxydase	Alkaline phosphatase	Horseradish peroxydase
Time (h)	8	3	<4	<3	5
Evaluation	Eye reading Semi quantitative by dilutions	Scan program semi-quantitative	Eye reading qualitative	Scan program (BlotMaster) semi-quantitative	Cut-off quantitative

✓ Protocole opératoire

La technique Maison est une technique longue et difficile à pratiquer en routine, réservée aux laboratoires d'immunologie spécialisés.

- Le temps de préparation des bandelettes est minutieux et demande 8 heures pour une centaine de bandes. Les bandelettes peuvent être conservées plusieurs mois à + 4°C.
- Des contrôles sont nécessaires à toutes les étapes de la préparation des bandelettes et des réactifs de l'immunorévélation.

- **Le coffret Dotzen** présente une assez bonne praticabilité :
 - Une étape de pré-dilution des sérums est nécessaire (dilution au 1/100)
 - Les bandelettes ne sont pas numérotées ce qui risque d'entraîner des erreurs lors des différentes étapes de lavage et d'immunorévélation.
 - **Le coffret Euroline Bioadvance** présente une bonne praticabilité.
 - Automatisation de la manipulation sur l'Euroblot Master
 - Automatisation de la lecture et de l'interprétation sur EuroLine Scan
 - Les bandelettes sont facilement maniables
 - Les lignes sont facilement interprétables.
 - **Le coffret Bühlmann** en microplaques ELISA présente la moins bonne praticabilité comparée aux coffrets par immunodot
 - Il nécessite l'utilisation d'un laveur de microplaques et d'un spectrophotomètre avec un filtre adapté pour la lecture (test ELISA)
 - Le temps de manipulation est relativement long : 5 heures.
 - **Le coffret Generic Assays** présente la meilleure praticabilité.
 - Dépôts de 10 µL de sérum pur dans chaque gouttière : absence de pré dilutions
 - Un seul réactif est nécessaire pour les étapes de lavage et de dilution.
 - Le nombre de lavages entre chaque étape est de 1 au lieu de 3.
 - Les lignes sont très fines et très proches les unes des autres (L = 4,5 cm, l = 2 mm) rendant l'interprétation difficile.
 - L'interprétation est le point le plus difficile. La lecture est délicate. Elle se fait par comparaison avec un profil témoin de positivité qui est de lecture délicate. La mise en place d'un scanner en 2011 a pu faciliter l'analyse des données.
 - Une numérisation des images doit permettre de définir un seuil décisionnel pour chacun des anticorps anti-gangliosides pour faciliter l'interprétation et la conservation des profils anticorps.
- ✓ **Les anticorps disponibles dans chacun des tests**

Les Ac définissant les profils anticorps anti-gangliosides spécifiques disponibles dans les 4 tests diagnostiques sont différents. Le nombre de gangliosides disponibles dans chacun des coffrets varie de 5 à 11. Nous présentons dans le **tableau 3** leur distribution dans le profil.

- **La technique maison** permet la détection de 8 anticorps anti-gangliosides et des anticorps anti-sulfatides. Le ganglioside GT1a en raison de son coût élevé ne fait pas partie du panel de gangliosides.

- **Le coffret Generic Assays** permet la détection du plus grand nombre d'anticorps anti-gangliosides. Il est de 11. L'intérêt diagnostique des gangliosides GM4 et GD2 reste à déterminer.

- **Le coffret Euroline Euroimmun** permet l'identification de 7 anticorps. Le ganglioside GT1a et le ganglioside GD3 ne font pas partie du panel. Ils sont cependant particulièrement importants dans 2 neuropathies périphériques : le syndrome de Miller Fisher et le CANOMAD syndrome.

- **Le test GanglioCombi Bühlmann** permet l'identification de 5 anticorps anti-gangliosides ainsi que de l'anticorps anti-asialo-GM1 qui ne semble pas apporter d'utilité clinique. 3 gangliosides importants sont manquants : le GD3, GT1a, GT1b ainsi que les sulfatides.

2.2.2 Reproductibilité des coffrets testés.

Elle a été testée sur les sérums de contrôle passés systématiquement dans chaque série. Une bonne reproductibilité est obtenue pour tous les réactifs en respectant scrupuleusement les temps d'incubation et surtout la température lors de la révélation enzymatique avec le substrat à 25°C.

2.3- Performances diagnostiques des tests à établir les profils anticorps anti-gangliosides caractéristiques

L'interprétation des profils Ac anti-gangliosides est difficile. En effet, le panel des antigènes cibles diffère d'un test à l'autre de 6 à 12. Les profils obtenus sont compliqués à comparer, notamment en ce qui concerne les CANOMAD syndromes qui présentent un profil à 6 Ac. Nous avons utilisé des critères de positivité minimaux (**tableau 4**) de façon à pouvoir analyser les résultats plus facilement en sachant que la mise en évidence d'un profil incomplet est source d'erreur.

Tableau 4 : Critères de positivité minimaux et recommandés pour l'interprétation

Clinical diagnosis	Recommended positivity criteria ^{1, 2, 9,12, 23}	Minimal positivity criteria *
GBS with ophthalmoplegia	GQ1b and additional GD1a /GT1a/GT1b IgG	GQ1b IgG
GBS: AMAN	GM1 ,GD1a and additional GT1a/ GT1b IgG	GM1 and GD1a IgG
GBS : AMSAN	GM1, GD1a,GD1b and GT1a/GT1b IgG	GM1, GD1a and GD1b IgG
MFS	GT1a and GQ1b IgG	GQ1b IgG
GBS post CMV infection	GM2 IgM	GM2 IgM
M-IgM chronic motor peripheral neuropathy	GM1 and GD1b	High levels of GM1 with M-IgM
CANOMAD	GD1b, GD3, GT1b, GQ1bIgM ²	High levels of antibodies:with M-IgM GQ1b and one disialylated gangliosides between: GD1b,GD2,GD3, GT1a , GT1b IgM
MMN	GM1 and GD1b IgM	GM1 IgM

*: Minimal criteria are based on basic profiles including 5 immunodominant gangliosides.

2.3.1 Sensibilité des tests: techniques de dilutions limites des sérums contrôles

La sensibilité a été appréciée par titrage des 2 sérums de contrôles positifs en anticorps IgM (patient MAI) et en anticorps IgG (patient SAP) en travaillant en dilutions limites pour les 2 techniques ayant la meilleure sensibilité diagnostique, la technique maison et Generic Assays.

✓ Sensibilité des tests : les profils Ac de classe IgM

○ Technique maison

Nous présentons dans la **figure 4a** le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI selon la technique maison. La dilution limite de positivité a été déterminée au 1/100 000 sur le sérum (patient MAI).

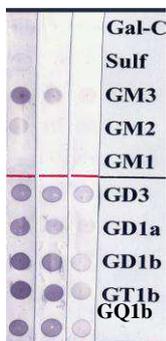


Figure 4a : Le profil anticorps anti-gangliosides (patient MAI) selon la technique maison aux dilutions 1/1000, 1/10 000, 1/100.

○ Technique Generic Assays

Nous présentons dans la **figure 4b** le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI selon la technique Generic Assays. La dilution limite de positivité a été déterminée au 1/10 000°

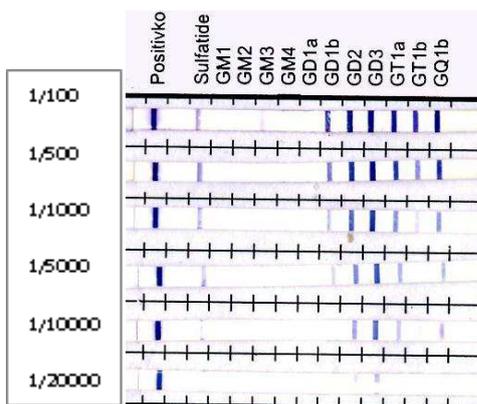


Figure 4b : Le profil anticorps anti-gangliosides (patient MAI) obtenu par le test Generic Assays aux dilutions : 1/100, 1/500, 1/1 000, 1/5 000, 1/10 000, 1/20 000.

✓ Sensibilité des tests : les profils Ac de classe IgG

○ Technique maison

Nous présentons dans la **figure 5a** le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP selon la technique maison. La dilution limite de positivité a été déterminée au 1/1 000 sur le sérum (patient SAP). Le dosage des Ac anti-GM1 par ELISA maison montre des taux supérieurs à 10 (N<1)

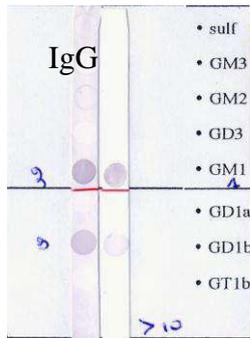


Figure 5a : Le profil anticorps anti-gangliosides (patient SAP) selon la technique maison aux dilutions 1/100 et 1/1000.

○ **Test Generic Assays**

Nous présentons dans la **figure 5b** le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP obtenu avec le test Generic Assays La dilution limite de positivité a été déterminée au 1/200 sur le sérum (SAP)



Figure 5b : Le profil anticorps anti-gangliosides (patient SAP) selon Generic Assays aux dilutions 1/50 (20µL), 1/100 (10µL) et 1/200(5µL).

2.3.2 Les profils anticorps anti-gangliosides obtenus avec les 4 tests sur le sérum de contrôle intra-laboratoire de classe IgM (patient MAI)

Nous présentons dans les **figures 4a à 4e** les profils anticorps caractéristiques obtenus avec le sérum de contrôle IgM anti-gangliosides disialylés (patient MAI) selon la technique maison et les 4 tests commerciaux.

○ **La technique maison (Figure 4a)**

D'après la **figure 4a** présentée page précédente, on note que le profil obtenu est :

- 1) IgM anti-gangliosides disialylés: NeuAc-NeuAc-Gal présent sur GD3, GD1b, GT1b, GQ1b
- 2) IgM anti-GM3 et GD1a pour l'épitope NeuNAc (α2-3) Gal terminal.

○ **Le test 1 Generic Assays (Figure 4b)**

D'après la **figure 4b** présentée page précédente, on note que le profil obtenu est IgM anti-gangliosides disialylés GD3, GD1b, GT1b, GQ1b, GD2, GT1a et anti-sulfatides.

○ **Le test 2 Dotzen Zentech (figure 4c)**

Nous présentons dans la **figure 4c** le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI obtenu avec le test Dotzen-Zentech. Le profil est IgM anti-gangliosides disialylés GD3, GD1b, GT1b, GQ1b et anti-sulfatides.

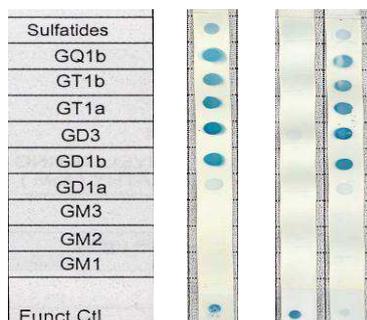


Figure 4c : Le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI obtenu avec le test Dotzen-Zentech.

○ **Le test 3 Euroimmun**

Nous présentons dans la **figure 4d** ci-dessous le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI obtenu avec le test Euroimmun. Le profil retrouvé est IgM anti-gangliosides GD1b, GQ1b.

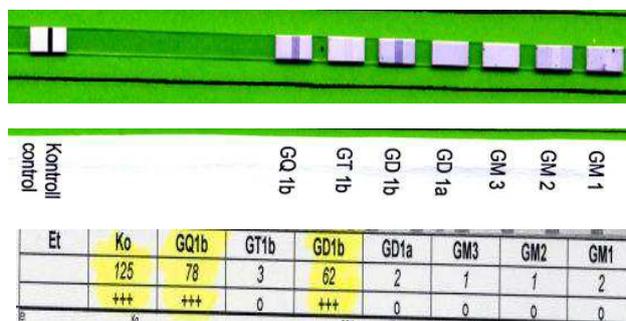


Figure 4d : Le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI obtenu par le test Euroimmun.

○ **Le test 4 Bühlmann**

Nous présentons dans la **figure 4e** ci-dessous le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI obtenu avec le test Bühlmann. Le profil obtenu est : IgM anti GQ1b et GD1b.

	Ganglioside	Absorbance	Ratio	
IgM Quality control serum(Mai)	GA1	108	6	Negative
	GM1	79	4	Negative
	GM2	219	12	Negative
	GD1a	1728	98	Positive
	GD1b	3464	197	Strong positive
	GQ1b	3638	207	Strong positive

Absorbance du calibrateur IgM : 2074)
 Interprétation des résultats selon le fabricant
 -Réponse négative inférieure à 30%
 -Zone grise entre 30 et 50%
 -Réponse positive 50 à 100%
 -Réponse fortement positive >100%

Figure 4e Le profil anticorps anti-gangliosides du patient MAI obtenu par le test Bühlmann.

- **Récapitulatif des profils obtenus avec le sérum du patient MAI : CANOMAD**

Les différents profils anticorps obtenus par les 4 tests sont résumés dans le **tableau 5**. Le test 1 met en évidence 6 Ac anti-gangliosides disialylés

Tableau 5: Les profils Ac obtenus par les 4 tests pour le sérum de contrôle de classe IgM (patient MAI)

tests	sulf	GM1	GM2	GM3	GM4	GD1a	GD1b	GD2	GD3	GT1a	GT1b	GQ1b	T	n
In-house	+	0	+/-	++	nd	+++	+++	nd	+++	nd	+++	+++	6	8
Test 1	++	0	0	0	+/-	+/-	+++	+++	+++	+++	++	+++	6	11
Test 2	nd	0	0	0	nd	+/-	++	nd	++	++	+	++	5*	9
Test 3	+	0	0	0	nd	0	++	nd	nd	nd	+/-	++	2	7
Test 4	nd	0	0	nd	nd	+	+++	nd	nd	nd	nd	+++	3	5

0: négatif

+/- : douteux

+: positif

++: positif fort

+++ positif très fort

nd: non détecté

T: Nombre total de gangliosides positifs

n: Nombre de gangliosides disponibles pour chaque technique

*: Reproductibilité insuffisante, des lots défectueux ont été observés.

2.3.3 Les profils anticorps obtenus par les 4 tests diagnostiques pour le sérum de contrôle intra-laboratoire de classe IgG (patient SAP)

Nous présentons dans les **figures 5a à 5e** le profil caractéristique du sérum IgG anti-gangliosides GM1 et GD1b d'un SGB moteur axonal suite à une infection par *Campylobacter jejuni* (patient SAP) par les différents tests.

- **Le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP selon la technique maison (Figure 5a)**

D'après la figure **5a**, on note que le profil obtenu est IgG anti-GM1 >GD1b

- **Le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP par le test Generic Assays (Figure 5b)**

D'après la figure **5b**, on note que le profil obtenu est IgG anti-GM1 >GD1b

- **Le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP par le test Ingen (Figure 5c)**

Nous présentons dans la **figure 5c** le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP selon le test Ingen. Le profil obtenu est IgG anti-GM1 >GD1b; GD1b très faiblement positif



Figure 5c : Le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP par le test Ingen

- **Le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP par le test Euroimmun**

Nous présentons dans la **figure 5d** le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP selon le test Euroimmun. Le profil obtenu est IgG anti-GM1. On ne retrouve pas le profil attendu.

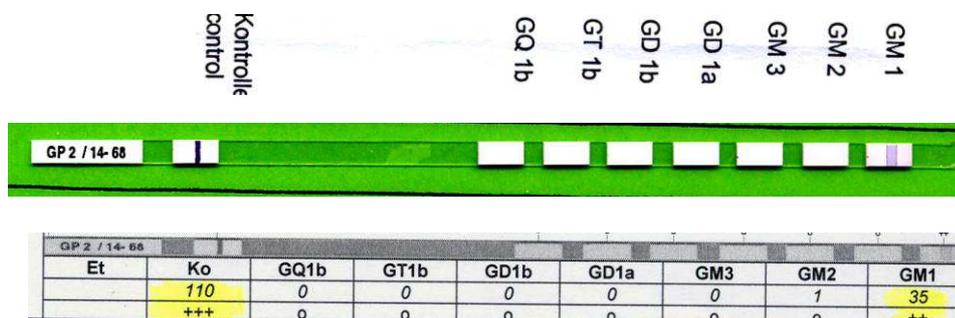


Figure 5d : Le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP par le test Euroimmun

- **Le profil anticorps anti-gangliosides SAP par le test GanglioCombi Bühlmann**

Nous présentons dans la **figure 5e** le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP selon le test Bühlmann. Le profil obtenu est : IgG anti-GM1 et GD1b fortement positif.

	DO Sérum	Ratio	%	Réponse
GA1	121	0,09	9	-
GM1	3897	2,92	>150%	+++
GM2	80	0,05	6	-
GD1a	107	0,08	8	-
GD1b	3942	2,95	>150%	+++
GQ1b	72	0,05	5	-

Absorbance du calibrateur IgG : 1330

Interprétation des résultats : Réponse négative inférieure à 30% -Zone grise entre 30 et 50%

Réponse positive 50 à 100% Réponse fortement positive >100%

Figure 5e : Le profil anticorps anti-gangliosides du patient SAP par le test Bühlmann.

- **Récapitulatif des profils obtenus avec le sérum du patient SAP**

Les différents profils anticorps obtenus par les 4 tests sont résumés dans le **tableau 6**. Nous notons que seule la technique maison permet d'identifier le ganglioside dominant GM1 évoquant une atteinte motrice.

Tableau 6: Les profils Ac anti-gangliosides obtenus avec les 4 tests pour le sérum de contrôle de classe IgG (patient SAP)

patient	Tests	sulf	GM1	GM2	GM3	GM4	GD1a	GD1b	GD2	GD3	GT1a	GT1b	GQ1b
SAP	in house dot	+	+++	0	0	0	0	++	/	0	/	0	0
	Generic Assays	0	++	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0
	Euroimmun	/	++	0	0	0	0	0	/	/	/	0	0
	Dotzen	0	++	0	0	0	0	+	/	0	0	0	0
	Bühlmann	/	+++	0	/	0	0	+++	/	/	/	/	0

0: négatif +/- : douteux +: positif ++: positif fort +++ positif très fort

2.3.4 Sensibilité diagnostique des tests à identifier les différents profils anti-gangliosides spécifiques de classe IgM.

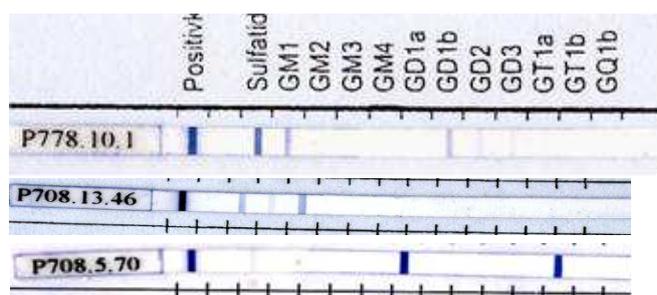
○ Generic Assays

-Les 21 profils anticorps anti-gangliosides attendus selon la technique maison ont bien été identifiés :

- 12 profils CANOMAD : IgM monoclonale à activité anti gangliosides disialylés : GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b.
(patients BRI, BRU, BUR, CHA, COE, DEG, GAR, LAL, MAN, MAI, RAV, VER.)
- 3 profils IgM monoclonale à activité anti GM1 et GD1b (patients RON, BAU, BAR)
- 1 profil IgM à activité anti GM1 et GD1b (patient MES)
- 1 profil IgM monoclonale à activité anti GD1a et GT1b (patient ROS)
- 2 profils IgM anti GM2 (patient NIC, CHO)
- 1 profil IgM monoclonale à anti sulfatides, GD1b, GM1 (patient FOR)
- 1 profil IgM et IgG anti-GM1 et GD1b (patient SAP)

Globalement, les profils sont bien retrouvés mais avec des intensités de réponse plus faibles que dans la technique maison. Les Ac anti-sulfatides sont souvent positifs.

Nous présentons dans la **figure 6** un exemple de 3 profils obtenus par le test Generic Assays.



Profil IgM anti-GM1, GD1b et sulfatides (patient RON)

Profil IgM anti-GM2 (patient NIC)

Profil IgM anti- GD1a, anti GT1b (patient ROS)

Figure 6:Exemple de profils anticorps de classe IgM obtenus par le test Generic Assays

○ Dotzen-Zentech

Les profils anticorps anti-gangliosides spécifiques définis par la technique maison ont été retrouvés dans 11 cas sur les 21 testés, soit une concordance de 50% environ (**tableau 7**).

Nous présentons **figure 7** un exemple de profils obtenus.

Les profils attendus sont retrouvés avec des intensités de réponse très faibles comparés à la technique maison et à Generic Assays. Des profils CANOMAD caractéristiques complets à 4 anticorps anti-gangliosides disialylés ne sont pas clairement identifiés alors qu'ils sont décelables à la dilution 1/10 000 par la technique maison.

Globalement, ce test diagnostique manque de sensibilité sur le lot que nous avons testé.

De biens meilleurs résultats avaient été relevés antérieurement sur d'autres lots [13-32].



Figure 7 : Exemple de profils anticorps de classe IgM obtenus par le test Dotzen/Zentech

○ **Euroimmun Bioadvance**

Les profils anticorps anti-gangliosides spécifiques définis par la technique maison ont été retrouvés dans 9 cas sur les 21 testés, soit une concordance de 45 % environ (**tableau 7**).

Nous présentons **figure 8** un exemple de plusieurs profils obtenus. Sur cette image, 4 profils sur 8 sortent positifs. Les profils CANOMAD caractéristiques complet à 4 anticorps anti-gangliosides disialylés ne sont pas clairement identifiés. Cette technique manque de sensibilité.



Figure 8 : Exemple de profils anticorps de classe IgM obtenus par le test Euroimmun

○ **GanglioCombi de Bühlmann**

Les profils anticorps anti-gangliosides spécifiques définis par la technique maison ont été retrouvés dans 15 cas sur 21, soit une concordance de 72% (**tableau 7**).

Les profils attendus sont retrouvés avec des intensités de réponse plus faibles comparées à la technique maison. Cette technique manque un peu de sensibilité en raison du choix du seuil décisionnel du calibrateur.

2.3.5 Tableau récapitulatif des sensibilités de classe IgM

Nous présentons dans le **tableau 7** la concordance de chaque test à identifier les profils anticorps de classe IgM selon la technique maison.

La sensibilité des tests à identifier les profils IgM est très variable d'un test à l'autre.

Le test Generic Assays présente la meilleure sensibilité. Les tests Euroimmun et Ingen sont insuffisamment sensibles avec une sensibilité respective de 43 % et 52%.

Tableau 7 : Concordance des 4 tests diagnostiques à identifier les profils IgM

	IgM		1	2	3	4
	Patients	Technique maison	GA	Ingen	Euroimmun	Bühlmann
1	BAR	+	+	+	0	+
2	BAU	+	+	+	+	+
3	BRI	+	+	0	+	0
4	BRU	+	+	0	+	+
5	BUR	+	+	+	+	+
6	CHA	+	+	+	0	+
7	CHO	+	+	+	+	+
8	COE	+	+	0	0	+
9	DEG	+	+	+	0	0
10	FOR	+	+	+	0	+
11	GAR	+	+	+	0	+
12	LAL	+	+	0	0	0
13	MAI	+	+	+	+	+
14	MAN	+	+	0	0	0
15	NIC	+	+	0	+	+
16	RAV	+	+	+	+	0
17	RON	+	+	0	0	+
18	ROS	+	+	+	0	+
19	VER	+	+	0	+	0
20	MES	+	+	0	0	+
21	SAP	+	+	0	0	+
	T+	21	21	11	9	15
	T	21	21	21	21	21
	%		100	52	43	72

+ : profil attendu

T+ : Nombre de profils retrouvés positifs

0 : profil non retrouvé ou incomplet

T : Nombre de sérums testés

% : Pourcentage de concordance (profils positifs/ sérums testés) : sensibilité

NB: Seuls les gangliosides immunodominants sont pris en compte dans l'analyse en raison du nombre limité de gangliosides et/ou manque de sensibilité de certains kits

2.3.6 Sensibilité diagnostique des 4 tests à mettre en évidence les profils anti-gangliosides spécifiques de classe IgG

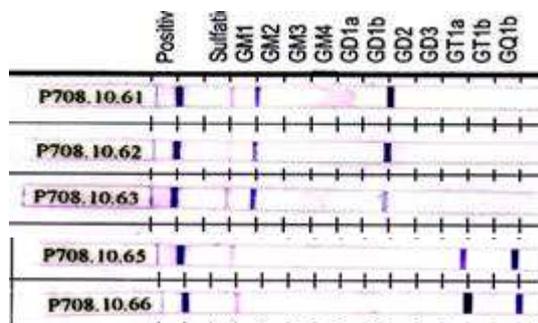
○ Generic Assays

Les 12 profils autoanticorps spécifiques définis par la technique maison ont été bien identifiés :

- 5 profils IgG à activité anti GM1, GD1b (patients SAP, GAB, ANO, POO, MAO)
- 1 profil IgG à activité anti GD1a, GT1a, GQ1b (patient ROZ)
- 1 profil IgG à activité anti GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b (patient BAL)
- 1 profil IgG à activité anti GT1a (patient ROU)
- 4 profils IgG à activité anti GT1a, GQ1b (patients SEV, BOU, PUG, OCA)

Le plus souvent, les intensités de réponse sont plus faibles que dans la technique maison.

Nous présentons **figure 9** plusieurs profils obtenus.



IgG anti GM1 et anti GD1b: SGB

IgG anti GT1a-, anti GQ1b: SMF

Figure 9: Exemple de profils anticorps de classe IgG obtenus par le test Generic Assays.

○ Dotzen-Zentech

Nous présentons **figure 10** plusieurs profils obtenus :

3 sérums sur les 12 testés ont été bien identifiés, soit une concordance de 25%. (**tableau 8**)

Les intensités de réponse sont très faibles comparées à celles retrouvés par Generic Assays et la technique maison.

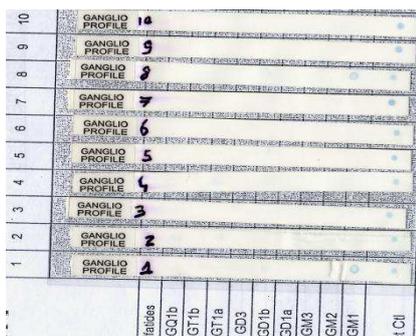


Figure 10: Exemple de profils anticorps de classe IgG obtenus par le test Dotzen/Zentech

- **Euroimmun Bioadvance**

Les profils anticorps anti-gangliosides spécifiques définis par la technique maison ont été retrouvés dans 4 cas sur les 12 testés, soit une concordance de 33 % environ (**tableau 8**).

Nous présentons **figure 11** plusieurs profils obtenus : 3 sérums sur les 8 testés ont été bien identifiés, testés dans deux séries différentes.

Les intensités de réponse sont bien faibles comparées à celles retrouvés par Generic Assays et la technique maison.

L'absence du ganglioside GT1a ne permet pas d'identifier le profil attendu (patient ROU) d'un SGB à forme bulbaire.



Figure 11: Exemple de profils anticorps de classe IgG obtenus par le test Euroimmun

- **GanglioCombi de Bühlmann**

Le test diagnostique présente une bonne sensibilité pour l'identification des profils de classe IgG. 10 sérums sur les 12 testés ont été bien identifiés (**tableau 8**).

Toutefois, l'absence du ganglioside GT1a ne permet pas d'identifier le profil attendu d'un SGB à forme bulbaire (patient ROU).

2.3.7 Tableau récapitulatif des sensibilités de classe IgG

Nous présentons dans le **tableau 8** la concordance de chaque test à identifier les profils anticorps de classe IgG selon la technique maison.

La sensibilité des tests à identifier les profils IgG est très variable d'un test à l'autre.

Le test Generic Assays présente la meilleure sensibilité. Les tests Ingen et Euroimmun sont insuffisamment sensibles avec une sensibilité respective de 25 % et 33%.

Tableau 8 : Concordance des 4 tests diagnostiques à identifier les profils IgG.

	IgG	1	1	2	3	4
	Patients	Technique maison	GA	Ingen	Euroimmun	Bühlmann
1	BAL	+	+	0	0	+
2	BOU	+	+	0	+	+
3	CRO	+	+	0	0	+
4	GAB	+	+	+	0	+
5	POO	+	+	0	0	+
6	MAO	+	+	+	+	+
7	OCA	+	+	0	0	0
8	PUG	+	+	0	+	+
9	ROZ	+	+	0	0	0
10	SAP	+	+	0	0	+
11	SEV	+	+	+	+	+
12	ANO	+	+	0	0	+
	ROU*	NP	+	0	NP	NP
	T+	12	12	3	4	10
	T	12	12	12	12	12
	%		100	25	33	82

+ : profil attendu

T+ : Nombre de profils retrouvés positifs

0 : profil non retrouvé ou incomplet

T : Nombre de sérums testés

% : Pourcentage de concordance (profils positifs/ sérums testés) : sensibilité

NP : ne se pratique pas : le ganglioside GT1a n'apparaît pas chez Euroimmun et Bühlmann.

*: profil GT1a +, SGB à forme bulbaire, non compté dans l'étude car non décelé par la technique maison.

2.3.8 Spécificité

Tous les sérums témoins du groupe contrôle négatifs testés se sont révélés séronégatifs dans les différents tests bien que quelques sérums se soient révélés faiblement positifs en Ac anti sulfatides et en GM1.

2.3.9 Performances diagnostiques : interprétation

Les performances diagnostiques des tests commerciaux sont présentées dans le **tableau 9**.

Les **figures 12 et 13** montrent le nombre total de résultats positifs pour chaque anticorps anti-gangliosides obtenus avec la technique maison et les 4 tests commerciaux.

La technique maison et le test 1 (Generic Assays) ont le meilleur taux de détection suivi par le test 4 (Bühlmann) tandis que les tests 2 (Dotzen) et 3 (Euroimmun) souffrent d'un manque de sensibilité.

Pour l'interprétation des résultats, en utilisant les critères minimaux de positivité (**tableau 4**), le test 1 (Generic Assays) apparait comme celui qui donne la meilleure corrélation par rapport à la méthode maison. Des résultats satisfaisants ont été obtenus pour le test ELISA sauf sur les échantillons CANOMAD.

Les tests 2 (Dotzen) et 3 (Euroimmun) confirment le manque de sensibilité déjà relevé.

Aucun des tests commerciaux ne semble pouvoir montrer la prédominance de l'Ac anti-GM1 sur l'anti-GD1b que l'on observait en technique maison par les dilutions limites (technique montrant la plus grande sensibilité).

Enfin, les tests 1 (Generic Assays) et 2 (Dotzen) sont les seuls qui permettent la détection des Ac anti-GT1a, anti-ganglioside représentant à lui tout seul un marqueur de diagnostic de choix pour les syndromes de Guillain-Barré à forme bulbaire.

Tableau 9: Performances diagnostiques des tests : profils anti-gangliosides spécifiques obtenus à l'aide de la technique maison et des autres tests en utilisant les critères de positivité.

Immune-mediated peripheral neuropathies	Number of samples	Anti-ganglioside autoantibody profiles detected by in-house immunodot	Number of positive samples using minimal positivity criteria*					Number of positive samples using recommended positivity criteria				
			Ih T	T1	T2	T3	T4	Ih T	T1	T2	T3	T4
AMAN and AMSAN	6	IgG antibodies against GM1>GD1b	6	6	3	1	6	6	6	3	1	6
Miller Fisher syndrome	4	IgG antibodies against GQ1b	4	4	2	3	3	0	4	1	0	0
GBS with ophthalmoplegia	1	IgG antibodies against GD1a, GQ1b	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
GBS with ophthalmoplegia	1	IgG antibodies against GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
GBS post CMV	2	IgM antibodies against GM2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
GBS Axonal motor post CJ	1	IgG and IgM antibodies against GM1 and GD1b	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
Total of acute PN	15		15	15	7	6	13	10	15	6	3	9
CANOMAD syndrome	12	M-IgM antibodies against GD1b, GD3, GT1b, GQ1b	12	12	6	5	7	12	10	3	0	0
Chronic motor neuropathy	3	M-IgM antibodies against GM1 and GD1b	3	3	2	1	3	3	3	2	1	3
Chronic motor neuropathy with lymphoma	1	M-IgM antibodies against GD1a and GT1b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Chronic sensory neuropathy	1	M-IgM antibodies against sulfatides>GD1b>GM1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MMN	1	IgM antibodies against GM1>GD1b	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Total of chronic PN	18		18	18	10	8	13	18	15	7	3	6
Total of PN	33		33	33	17	14	26	28	30	14	9	15

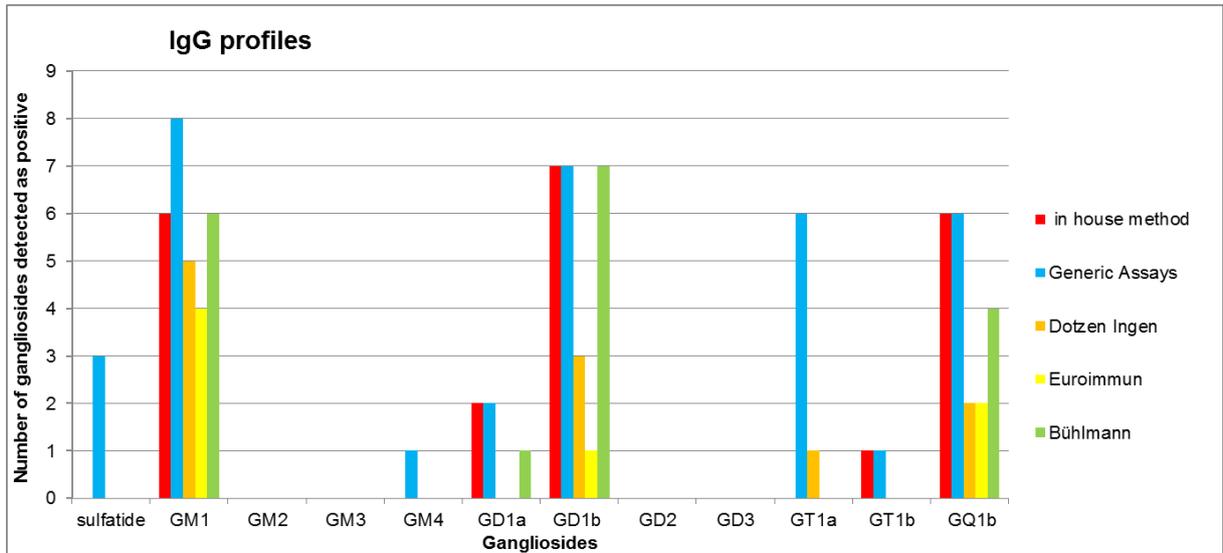


Figure 12: Représentation graphique illustrant le nombre de gangliosides positifs pour les 12 profils IgG sur chacun des tests.

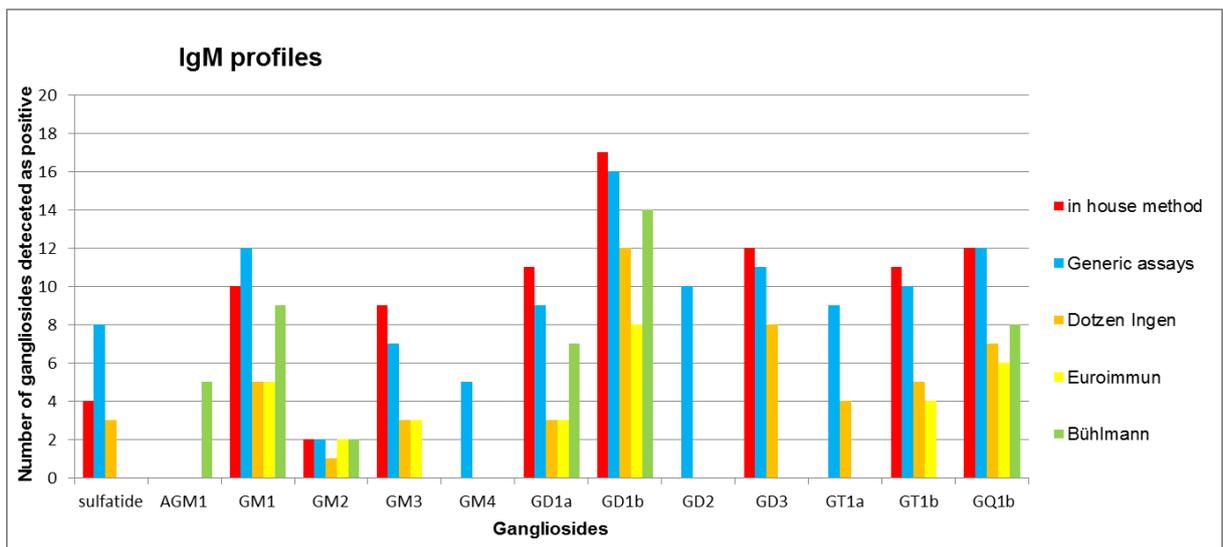


Figure 13: Représentation graphique illustrant le nombre de gangliosides positifs pour les 21 profils IgM sur chacun des tests.

2.4 Les points pour améliorer les performances analytiques et diagnostiques des tests

- **Le test Bühlmann**

- L'emploi d'un panel de gangliosides plus étendu en intégrant les gangliosides GD3 et GT1b pour mieux répondre à la définition des profils caractéristiques des CANOMAD syndromes.
- Le remplacement de l'asialo-GM1 en raison de son faible intérêt clinique par un autre ganglioside tel le GT1a, marqueur clinique intéressant.
- L'utilisation d'un calibrateur IgM adapté afin d'améliorer la sensibilité ; en effet, celui proposé par Bühlmann semble trop élevé et expliquerait un relatif manque de sensibilité.

- **Le test Dotzen/ Zentech (Ingen)**

- La numérotation des bandelettes afin d'éviter les erreurs lors des manipulations.
- L'augmentation du volume de sérum nécessaire afin d'augmenter la sensibilité qui se relève bien insuffisante.
- La reproductibilité des lots doit être améliorée. De grosses différences de sensibilité ont été observées parmi les 2 lots testés.

- **Le test Euroimmun**

- L'emploi d'une gamme de gangliosides plus étendue en intégrant d'une part le ganglioside GT1a pour mieux correspondre à la définition des profils caractéristiques du syndrome de Miller Fisher et du SGB à forme bulbaire, et d'autre part le ganglioside GD3 afin de mieux correspondre à la définition des profils caractéristiques des CANOMAD.
- L'emploi de faibles dilutions des sérums afin d'augmenter la sensibilité.

- **Le test Generic Assays**

- Diminution de la charge en sulfatides pour limiter le nombre de faux positifs.
- Augmentation de la charge en GM1, GT1b et GQ1b en raison de quelques faux négatifs observés
- Mise en place d'un logiciel couplé à un scanner afin d'améliorer la lecture, le rendu et la conservation des résultats : travail en cours de validation.
- Ajout de colorants dans le flacon contenant le conjugué respectant le code couleur fixé et correspondant à la couleur du bouchon (rouge pour IgG, vert pour IgM) afin d'éviter tout risque d'erreur lors de la manipulation: travaux en cours de validation.
- Remplacer le sérum de contrôle interne mis en place en janvier 2012 (positif en anti-GM1 IgG et IgM). Celui-ci s'est révélé non adapté car non spécifique de la caractérisation du profil IgG ou IgM.

3. DISCUSSION

Nous avons évalué les performances analytiques et diagnostiques de 4 coffrets réactifs, **Generic Assays**, **Euroline Euroimmun**, **GanglioCombi Bühlmann** et **Dotzen/Zentech** sur une série de sérums dont les profils anticorps avaient été déterminés préalablement par la technique d'immunodot maison. Au total 33 sérums ont été analysés : 12 sérums de patients présentant un profil caractéristique de classe IgG et 21 sérums de patients présentant un profil caractéristique de classe IgM.

Plusieurs points doivent être considérés pour l'interprétation des profils anticorps spécifiques de classe IgG et IgM en entités cliniques bien définies [23, 25-29].

- Premièrement, les profils spécifiques obtenus par les différents tests ont été difficiles à comparer en raison d'une très large hétérogénéité de réponses anticorps contre les gangliosides cibles. Pour les 5 antigènes présents dans tous les tests sur un total de 13: (GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b), l'intensité de la réponse était très variable d'un test à l'autre. Des profils hautement spécifiques, impliquant des gangliosides immunodominants présents à des titres importants, n'ont pas été détectés dans plusieurs tests.
- Deuxièmement, dans le but de faciliter la comparaison, nous avons sélectionné des sérums présentant une forte réactivité par la technique maison, c'est-à-dire avec des titres élevés en Ac anti-gangliosides spécifiques sur des patients dont le diagnostic clinique est parfaitement connu. Les anticorps anti-glycolipides ayant une faible affinité comparés aux anticorps anti-peptides, nous avons exclu les sérums à réactivité modérée par la technique maison de façon à limiter le nombre de sérums à interprétation difficile.
- Troisièmement, [14, 33, 57, 58] les autoanticorps reconnaissent mieux les gangliosides lorsqu'ils sont fixés sur membrane hydrophobiques que lorsqu'ils sont fixés sur les cupules polystyrènes de plaque ELISA. La technique maison et les tests qui en découlent utilisent une membrane PVDF qui apparait beaucoup plus adaptée car plus proche du modèle in vivo observé sur la membrane cellulaire naturelle.

Selon les caractéristiques cliniques, électrophysiologiques et immunologiques de notre panel de sérums, **le test 1 Generic Assays**, apparait comme le test le plus performant, comparé à la méthode maison. Il permet d'identifier simultanément le plus grand nombre d'anticorps anti-gangliosides soit 11 Ac anti-gangliosides. La détection des anticorps anti-gangliosides sur le plus grand nombre de gangliosides permet d'améliorer les performances diagnostiques [58]. En offrant un panel de 6 gangliosides disialylés, ce test est le test de choix pour l'analyse des sérums de patients présentant un syndrome CANOMAD. Ce test ainsi que les 3 autres ne permet pas d'inclure le ganglioside dominant contrairement à la technique maison.

Le test 1 présente la meilleure praticabilité parmi les 4 tests étudiés. On a observé une bonne corrélation entre l'intensité des bandes et les titres des autoanticorps. Les bandes sont bien visibles avec un minimum de bruit de fond. Les bandes faiblement colorées étaient difficilement interprétables. Une évaluation quantitative de l'intensité colorimétrique des bandes par l'intermédiaire d'un lecteur scanner a donc été mise au point après cette étude afin de faciliter la lecture. Cette technologie récemment testée dans le laboratoire a donné des résultats pertinents. Des derniers ajustements afin d'améliorer encore la sensibilité sont prévus et devraient être récemment mis en place.

CONCLUSION

Dans le cadre du diagnostic de neuropathies périphériques auto-immunes pouvant bénéficier de traitements à visée immunologique, la mise en évidence des autoanticorps anti-gangliosides est très utile.

La détection des différents profils permet de distinguer en fonction de la classe des anticorps, des pathologies aiguës de type syndrome de Guillain-Barré ainsi que les variants (AMAN, AMSAN, SMF) ou des pathologies chroniques de type NMMBC, motrices pures, ou encore associées à une IgM monoclonale (sensitives de type CANOMAD).

La mise sur le marché de nouveaux tests commerciaux pour remplacer la technique « maison » soulève des questions pour le biologiste quant au choix du test à utiliser pour un diagnostic optimisé.

Le but de notre travail a été de comparer et d'évaluer les performances analytiques et diagnostiques de 4 tests diagnostiques présents sur le marché : Generic Assays/Labodia: Anti-Gangliosid Dot¹, Zentec/Ingen: Dotzen®² Ganglio Profile Ab, Euroimmun/BioAdvance: Euroline ganglioprofile³ et Bühlmann: GanglioCombi®⁴.

Nous avons analysé 33 sérums de neuropathies auto-immunes bien documentés sur le plan clinique, électrophysiologique et biologique, issus de la sérothèque du laboratoire, présentant un profil anticorps anti-gangliosides caractéristique, 12 profils de classe IgG, 21 de classe IgM et 10 neuropathies contrôles avec anticorps négatifs.

Les réponses des profils IgG et IgM ont été plus hétérogènes qu'attendu avec une sensibilité variant de 30 à 100% selon les tests.

Le test 1 Generic Assays présente les performances les plus satisfaisantes.

Sur le plan analytique, il présente la meilleure praticabilité et le plus large panel de gangliosides.

Sur le plan diagnostique, il présente la meilleure sensibilité et la plus grande concordance de résultats avec la technique d'immunodot maison.

Des améliorations en terme de praticabilité, de sensibilité et de contrôle qualité ont été proposées pour chacun des 4 tests à la suite de ce travail.

Cette étude a été présentée sous forme d'un poster au 10e congrès international d'auto-immunité de Dresde en 2011. Un article a été récemment soumis pour publication à la revue Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Vallat JM, Hugon J. Neuropathies périphériques. *Encycl Med Chir, Neurologie*, 17100 A10, 7-1989.
- [2] Bouche P, Léger JM, Vallat JM. *Traité de neurologie : Polyneuropathies et mononeuropathies multiples*. In: Doin editor. *Neuropathies Périphériques* 2004. 197-221.
- [3] Bron D, Steck AJ. Neuropathies périphériques. *Forum Med Suisse* 2006 ; 6:209-14.
- [4] Péreon Y, Nguyen S, Tich T, Guihéneuc P. Peripheral neuropathy: a picture is worth a thousand words. *Neurophysiol Clin* 2003; 33(1):31-2.
- [5] Boussaïd I. Apport des anticorps anti-gangliosides dans l'identification d'une neuropathie périphérique : le syndrome CANOMAD. *Th D Pharm, Lyon I* ; 2011.
- [6] Stojkovic T. Les neuropathies périphériques : orientation et moyens diagnostiques. *Rev Med Interne* 2006 ; 27(4) : 302-12.
- [7] Goetz J, Humbel RL. Neuropathies périphériques auto-immunes. *Revue francophone des laboratoires* 2008. N°404 bis.
- [8] Humbel RL. *Autoanticorps et maladies auto-immunes* 2^{ème} éd. Paris : Elsevier ; 1997.
- [9] Steck AJ. Anticorps et système nerveux périphérique. In: Doin editor. *Neuropathies Périphériques* 2004 ; 181-95.
- [10] Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Mori A, Sugiura Y, Furukawa K, et al. Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(52): 22405-10.
- [11] Willison HJ, O'Hanlon GM, Paterson G, Veitch J, Wilson G, Roberts M, et al. A somatically mutated human antiganglioside IgM antibody that induces experimental neuropathy in mice is encoded by the variable region heavy chain gene, V1-18. *J Clin Invest* 1996; 97(5): 1155-64.
- [12] Aqallal A. Les profils anticorps anti-gangliosides dans l'identification des différentes entités immunocliniques du syndrome des IgG anti-GQ1b. A propos de 78 cas. *Th D Pharm, Lyon I*; 2009.
- [13] Reymond A. Evaluation de 3 coffrets réactifs commercialisés pour la détection des profils autoanticorps anti-gangliosides associés aux neuropathies périphériques dysimmunitaires et contribution au développement d'un nouveau coffret révélant la monoclonalité de la réponse anticorps. *Th D Pharm, Lyon I*; 2007.
- [14] Willison HJ. The immunology of Guillain-Barré syndromes. *J Peripher Nerv Syst* 2005; 10: 94-112.
- [15] Yuki N. Infectious origins of an molecular mimicry in Guillain-Barré and Fisher syndromes. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 21-28.
- [16] Quarles RH, Weiss MD. Autoantibodies associated with peripheral neuropathy. *Muscle Nerve* 1999; 22: 800-22.
- [17] Kusunoki S, Kaida K. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *J Neurochem*. 2011; 116(5):828-32.

- [18] Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: mini-review. *J Neuroimmunol* 2010; 223(1-2):5-12.
- [19] Nobile-Orazio E, Giannotta C, Briani C. Anti-ganglioside complex IgM antibodies in multifocal motor neuropathy and chronic immune-mediated neuropathies. *J Neuroimmunol* 2010; 219(1-2):119-22.
- [20] Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J, Blumhardt LD, Busby M, Donaghy M et al. The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 2001; 124:1968-77.
- [21] Ilyas AA, Quarles RH, Dalakas MC, Fishman PH, Brady RO. Monoclonal IgM in a patient with paraproteinemic polyneuropathy binds to gangliosides containing disialosyl groups. *Ann Neurol* 1985; 18: 655-9.
- [22] Obi T, Kusunoki M, Takatsu, Mizoguchi, Nishimura Y. IgM M-protein in a patient with sensory-dominant neuropathy binds preferentially to polysialogangliosides. *Acta Neurol Scand* 1992; 86: 215-8.
- [23] Alaedani A, Latov N. Detection of anti-GM1 ganglioside antibodies in patients with neuropathy by a novel latex agglutination assay. *J Immunoassay* 2000; 21: 377-386.
- [24] Latov N, Alaedani A. Detection of anti-glycolipid antibodies by latex agglutination assay US20030049692A1; 2003.
- [25] Escande-Beillard N, David MJ, Portoukalian J, Pouget J, Azulay JP et al. A sensitive flow cytometry method for anti-GM1 antibody detection. *J Neurol* 2002; 125: 163-9.
- [26] Chabraoui F, Derrington EA, Mallié-Didier F, Confavreux, C Quincy Cl, Caudie C. Dot-blot immunodetection of antibodies against GM1 and other gangliosides on PVDF-P membrane. *J Immunol Methods* 1993; 165: 225–30.
- [27] Rahmouni-Chabraoui F. Contribution à l'étude des autoanticorps anti-gangliosides dans les neuropathies périphériques et la maladie du motoneurone. Th Doctorat, Lyon I; 1994.
- [28] Caudie C, Vial C, Bancel J, Petiot P, Later R, Gonnaud PM. Measurement of antiganglioside autoantibodies by immunodot-blot assay: clinical importance in peripheral neuropathies. *Ann Biol Clin Paris* 1999; 57: 579-88. French.
- [29] Caudie C. Monoclonal IgM autoantibody reactivity in M-IgM peripheral neuropathy. *Clin Rev Allerg Immunol* 2000; 19: 7-18.
- [30] Caudie C, Vial C, Bancel J, Petiot P, Antoine JC, Gonnaud PM Anti-ganglioside antibody profiles in Guillain–Barre syndrome. *Ann Biol Clin Paris* 2002; 60: 589-97 French.
- [31] Caudie C, Quittard Pinon A, Taravel D, Sivadon-Tardy V, Orlikowski D, Rozenberg F, et al. Preceding infections and anti-ganglioside antibody profiles assessed by a dot immunoassay in 306 French Guillain–Barré syndrome patients. *J Neurol* 2011; 258: 6042-49.
- [32] Caudie C, Reymond A, Antoine JC, Petiot P, Gonnaud PM, Vial C. Screening for anti-glycolipid antibody profiles from patients with immune peripheral neuropathies by Dotzen Ganglio Profile antibodies. *Ann Biol Clin Paris* 2006; 64(2):149–56. French.
- [33] Conrad K, Schneider H, Ziemssen T, Talaska T, Reinhold D, Humbel RL, et al. A new line immunoassay for the multiparametric detection of antiganglioside autoantibodies in patients with autoimmune peripheral neuropathies. *Ann N Acad Sci* 2007; 1109:256-64.

- [34] Caudie C, Vial C, Petiot P, Bouhour F. Serum antibody profiles against gangliosides and sulfatide in peripheral neuropathies: evaluation of a new immunoassay. *Ann Biol Clin Paris* 2010 68(6):675–80. French.
- [35] Ravindranath MH, Morton DL, Graves MC. Factors affecting the fine specificity and sensitivity of serum anti-gangliosides antibodies in ELISA. *J Immunol Methods* 1994; 169: 257-72.
- [36] Vincent A. Measuring and evaluating the significance of autoantibodies in neurological disorders. *Clin Applied Immunol Rev* 2002; 3: 127-51.
- [37] Hahn AF. Polyradiculonévrites aiguës : syndrome de Guillain-Barré et affections voisines. In: Doin editor. *Neuropathies Périphériques*, Vol 2; 2004. p.197-229.
- [38] Hahn AF. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet* 1998; 352: 635-41.
- [39] Hughes RA, Hadden RD, Gregson NA, Smith KJ. Pathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *J. Neuroimmunol* 1999; 100: 74-97.
- [40] Orphanet. Le syndrome de Guillain-Barré.
<http://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/GuillainBarre-FRfrPub834.pdf> consulté le 13 mars 2012.
- [41] Taravel D. Etablissement de profils auto-anticorps anti-gangliosides dans une série de 303 syndromes de Guillain-Barré par les techniques d'immunodot et GangliCombi®. *Th D Pharm, Lyon I*; 2008.
- [42] Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FG, Herbrink P, Schmitz PI, de Klerk MA et al. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome. A case-control study. *Neurology* 1998; 51(4):1110-5.
- [43] Hadden RD, Karch H, Hartung HP, Zielasek J, Weissbrich B, Shubert J et al. Preceding infections, immune factors and outcome in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2001;56: 758-65.
- [44] Yuki N, Taki T, Takahashi M, Saito K, Yoshino H, Tai T et al. Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Fisher's syndrome. *Ann Neurol* 1994; 36: 791-93.
- [45] Afssaps. Le syndrome de Guillain-Barré
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/80c13b0df57cbfafa5551a115d8c402f.pdf, consulté le 5 mars 2012
- [46] Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1990; 27 (suppl): S21-S24.
- [47] Lewis RA, Sumner AJ, Brown MJ, Asbury AK. Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology* 1982; 32:958-64.
- [48] Parry GL, Clarke S. Multifocal acquired demyelinating neuropathy masquerading as motor neuron disease. *Muscle Nerve* 1988; 11:103-7.
- [49] Pestronk A, Cornblath DR, Ilyas AA, Baba H, Quarles RH, Griffin JW, et al. A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 1988; 24(1): 73-8.

- [50] Léger JM. Neuropathies motrices multifocales avec blocs de conduction persistants. In: LFB. Neuropathies périphériques auto-immunes chroniques, 2006; 24-33.
- [51] O'Leary CP, Hugh JW. The role of antiglycolipid antibodies in peripheral neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2000; 13: 583-88.
- [52] Braun PE, Frail DE, Latov N. Myelin associated glycoprotein is the antigen for monoclonal IgM in polyneuropathy. *J Neurochem* 1982; 39: 1261-5.
- [53] Steck AJ, Murray N, Meier C, Page N, Perruisseau G. Demyelinating neuropathy and monoclonal IgM anti body to myelin-associated glycoprotein. *Neurology*, 1983; 33: 19-23.
- [54] Latov N. Pathogenesis and therapy of neuropathies associated with monoclonal gammopathies. *Ann. Neurol* 1995; 37: 32-42.
- [55] Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 2002; 125:2591-2625.
- [56] Delval A, Stojkovic T, De Seze J, Hurtevent JF, Glowacki F, Beaume A, et al. Neuropathie ataxiante associée à des anticorps anti-gangliosides disialylés : description de nouvelles formes cliniques et biologiques. *Rev Neurol Paris* 2004 ; 160(10) : 910-16.
- [57] Willison HJ, Goodyear C, Brennan K, Rinaldi S. Detection of interactions between lipid complexes and lipid binding agents. WO 2010 001131; 2010
- [58] Willison HJ, Veitch J, Swan AV, Baumann N, Comi G, Gregson NA, et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Euro J Neurol* 1999; 6 (1): 71-77.

ANNEXE

1) Poster présenté lors du 10^e symposium international d'auto-immunité de Dresde du 22 au 25 septembre 2011: "Multiparametric detection of anti-ganglioside antibodies by comparing a routine in-house immunodot with 5 commercial immunoassays in patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies".

2) Caudie C, Quittard Pinon A, Taravel D, Sivadon-Tardy V et al. Preceding infections and anti-ganglioside antibody profiles assessed by a dot immunoassay in 306 French Guillain–Barré syndrome patients. *J Neurol* 2011; 258: 6042-9.

3) Article soumis pour publication au journal *Clinical Laboratory*:
Caudie C, Quittard Pinon A, Bouhour F, Vial C, Garnier L, Fabien N.
Comparison of commercial tests for detecting multiple anti-ganglioside autoantibodies in patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies.

Multiparametric detection of anti-ganglioside antibodies by comparing a routine in-house immunodot with 5 commercial immunoassays in patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies



10th Dresden symposium on autoantibodies – 2011 –



Hôpitaux de Lyon

Christiane Caudie ¹, Arnaud Quittard Pinon ¹, Françoise Bouhour ², Christophe Vial ², Nicole Fabien ¹

¹ Immunologie, Groupement Hospitalier Lyon Sud 69495 Pierre-Bénite,

² Electroneuromyographie et Pathologies Neuromusculaires, Groupement Hospitalier Est, Hôpital Neurologique 69677 Bron
Christiane.caudie@chu-lyon.fr

Background

The accreditation process underway in our laboratory requires the selection of the best available methods. Therefore, we investigated the feasibility of detecting anti-ganglioside antibodies in clinical practice by available commercial tests. These tests need to be validated.

Objective

The study aimed to determine serum anti-ganglioside antibodies on a well-characterized cohort of patients with acute and chronic immune-mediated peripheral neuropathies by available commercial immunoassays. The complex antibody profiles were compared with those previously obtained by our dot immunoassay. In the sample selection, we included several CANOMAD sera, as our group is currently involved in the establishment of the French national register of the CANOMAD syndrome (Chronic Ataxic Neuropathy with Ophthalmoplegia, M-paraprotein, cold Agglutinins, Disialosyl antibodies).

Material and methods

We selected and tested high IgG reactivities in stored sera of 12 Guillain-Barré syndrome/variants and high IgM reactivities in 18 chronic autoimmune neuropathies including 12 CANOMAD syndrome, 2 CMV-GBS, 1 *C. jejuni*-GBS and 10 control patients with neuropathy but without any antibody to gangliosides by our dot assay.

All stored sera from collection were aliquoted and stored at -20°C until used.

We compared our dot immunoassay to 5 commercialized immunoassays (4 immunodot assays and 1 ELISA), according to the manufacturer's instructions to identify distinct carbohydrate epitopes on panels of glycolipid antigens:

- 1- Dotzen®/Zentec from Ingen France (10 antigens)
- 2- Generic Assays Germany from Labodia France (12 antigens)
- 3- Euroline Euroimmun from Bio Advance France (7 antigens)
- 4- Bio Medical Diagnostics, BMD France (10 antigens)
- 5- GanglioCombi®ELISA Bühlmann France (6 antigens)

For intra-laboratory quality controls we used the sera from 2 patients.

Results

- All commercialized tests had a fast turn around time, easy handling, especially tests 2 and 3 compared to our routine assay. Both positive and negative controls were not included in tests. For intra-laboratory quality controls we used the sera from 2 patients to test the reproducibility: one CANOMAD syndrome sample and one *C. jejuni* infected GBS sample (AMAN).

- The simultaneous detection of antibodies on a panel of 6 to 12 glycolipid antigens: gangliosides, sialosylGM1, sulfatides, galactocerebroside showed 1) significant variation of sensitivity from 30 to 100%, 2) a similar specificity of 100%, 3) antigen band intensity correlates with the antibody titre, 4) fine specificity of antibodies was more diverse than expected, 5) quantitative results were obtained by tests 3 and 5, 6) possibility of automation by test 3.

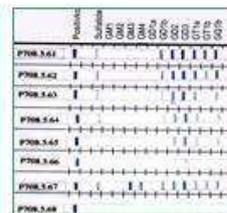
- A good concordance was found between test 2 and our routine dot assay with slight differences in the reactivity against minor gangliosides.

- Weakly stained bands, eye reading, were not easily interpreted.

- No testing of anti-kappa and anti-lambda light chains to show monoclonal IgM reactivity against disialylated gangliosides in CANOMAD syndrome.

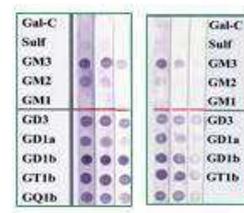
	In-house dot assay	Test 1 Generic	Test 2 GA	Test 3 Euroimmun	Test 4 BMD	Test 5 GanglioCombi
Duration	15 min					
Complexity	simple	simple	simple	simple	simple	simple
Sample	serum	serum	serum	serum	serum	serum
Cost	low	low	low	low	low	low
Automation	no	no	no	no	no	no
Specificity	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Sensitivity	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Readability	visual	visual	visual	visual	visual	visual
Reproducibility	high	high	high	high	high	high
Turn around time	15 min					
Validation	well-characterized neuropathies and controls					

Main characteristics of the 5 immunoassays compared to those of our in-house assay



Generic Assays

55 to 56: Semi-quantification CANOMAD sample (Maj): 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000
57: CANOMAD sample (BUR): IgM against disialylated gangliosides GD1b + GD2 + GD3 + GT1a + GT1b + GQ1b + GT1c + GT1d and against GM3 + GM2
58: Seronegative sample



In-house dot assay

Semi-quantification CANOMAD sample (Maj): IgM against disialylated gangliosides GD1b + GD3 + GT1b + GQ1b and against GM3 + GM2
On the left: 1/100, 1/500, 1/5000
On the right: 1/1000, 1/10000, 1/50000

Discussion

The comparison of anti-ganglioside and anti-sulfatide antibody profiles from 5 commercial tests with in-house dot assay was complex with differences, in number of antigens from 6 to 12 and in intensity of reactivity. According to the clinical, electrophysiological and immunological criteria of the tested autoimmune neuropathies, the test 2 gives the best concordance with our routine dot assay with slight differences in the reactivity. It was the most sensitive assay in clinical routine use detecting 12 types of anti-glycolipid antibodies.

It gave the finest specificity of antibodies and was the most appropriate test for the precise diagnosis of CANOMAD syndrome with a specific autoantibody profile against the disialylated gangliosides GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b.

It was one of the easiest immunoassay.

Measurement of anti-ganglioside and sulfatide antibodies involves several steps in combination with clinical and electrophysiological data 1) characterisation IgG or IgM, 2) demonstration of fine specificities to a large panel of gangliosides and sulfatide, 3) antibody titers, 4) monoclonal immunoreactivity.

These data also indicate the urgent need for standardization of anti-ganglioside assays and exchange of high levels sera that can be used as reference standards.

Reproduction de l'article original non autorisée

C.f : Christiane Caudi, Arnaud Quittard-Pinon, Didier Tavel, Valérie Sivadon-Tardy, David Orlikowski, Flore Rozenberg, Tarek Sharshar, Jean-Claude Raphaël, Jean-Louis gaillard.
Preceding infections and anti-ganglioside antibody profiles assessed by a dot immunoassay in 306 french Guillan-Barré syndrome patients. J. Neurol., 2011, 258, 1958–1964 ;
ISSN 1432-1459

Introduction

Measurement of anti-glycolipid antibodies is a relatively new diagnostic test. Antibodies against more than 20 different gangliosides have now been associated with a wide range of clinical entities, including a number of acute and chronic peripheral neuropathies (1). Depending on the types of neuropathy, different anti-ganglioside antibodies are observed. Anti-ganglioside antibodies can be detected using several methods, either qualitative or quantitative. All of them have advantages and drawbacks. Laboratories can measure levels of anti-ganglioside antibodies in serum using thin-layer chromatography (TLC) overlay (2-4), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (2-4), agglutination tests (5-6), flow cytometry (7), and in-house (8-12) or commercial immunodot or immunoline assays (13, 14). These approaches differ substantially in their accuracy, sensitivity and specificity. Several parameters, such as: incubation at 4° C rather than room temperature, high background values due to non-specific binding, detergent treatment, purity of gangliosides from different commercial sources, coating process of gangliosides, cut-off values to discriminate between patients and controls, may influence the assessment of serum anti-ganglioside antibodies by immunoassays (16). There is an increased need for simple, multi-parametric detection of anti-ganglioside antibodies to diagnose immune-mediated peripheral neuropathies. The “gold standard” TLC overlay is carried out in specialized laboratories and is not routinely available. The same limitation applies to our in-house immunoassay validated by TLC (8-12). There is a clear demand for replacement of in-house anti-ganglioside antibody detection methods by commercial tests which need validation before routine clinical use. A great variability in the frequency of IgM or IgG anti-GM1 antibodies detected by ELISA assays has been observed, either in the same laboratory or between laboratories (16). There is still no consensus on the most effective and the most reproducible procedure to use. IgG and IgM antibodies bound to dominant gangliosides may react equally or preferentially with other related gangliosides. Since commercial tests are now in widespread use, we thought that it was critical to determine their diagnostic performance. A key issue is the number of target antigens included in each commercial assay as it has been shown that a large panel of gangliosides is essential to correctly identify complex antibody profiles specific for patients with Guillain-Barré syndrome or its variants (12) or with chronic ataxic neuropathy with ophthalmoplegia, M-paraprotein, cold agglutinins, disialosyl antibodies (CANOMAD) syndrome (2). Until now, the reliability of anti-ganglioside antibody measurements provided by different tests has not been evaluated appropriately and the results obtained in different laboratories are difficult to compare. Moreover, the current accreditation process in our laboratory requires the selection of the best available test. Therefore, we investigated the performance of anti-ganglioside antibody detection in clinical practice by four commercial tests. We analyzed the concordance of the results by comparing them with those obtained with our in-house dot test. Patients with CANOMAD syndrome were selected according to their specific anti-ganglioside antibody profiles as our group is currently involved in the establishment of the French national registry of CANOMAD syndrome.

Material

1- Sera and patients selection

Sera with high levels of anti-ganglioside antibodies from 33 patients with immune-mediated peripheral neuropathy, previously tested in our laboratory and stored at -20°C were selected based on positivity in the in-house IDA.

Sera were collected from 15 patients with acute peripheral neuropathies showing Guillain-Barré syndrome and related variants including 6 patients with acute motor (AMAN) and motor sensory axonal neuropathies (AMSAN), 4 with typical Miller Fisher syndrome (SMF) 2 patients with GBS with ophthalmoplegia, 2 with CMV induced GBS demonstrating IgM anti-GM2 antibodies, and 1 patient with *Campylobacter jejuni* induced GBS showing IgM antibodies. Furthermore, 18 patients with chronic peripheral neuropathies were enrolled into the study including 12 patients with CANOMAD syndrome demonstrating all clinical and serological characteristics of the syndrome reported by Willison (2), 4 patients with motor chronic neuropathies associated with monoclonal IgM (M-IgM) antibodies, 1 patient with chronic sensory neuropathy with M-IgM antibodies, and 1 with multifocal motor neuropathy demonstrating persistent conduction block. The control sera were obtained from 10 patients with suspected non-autoimmune neuropathy without anti-ganglioside antibody presence confirmed by in-house immunoassay: 6 cases of amyotrophic lateral sclerosis and 4 pure axonal sensory neuropathies.

2- Anti-ganglioside antibody assays

2-1 Anti-ganglioside antibody by in-house immunodot assay

The antibodies to gangliosides were detected by our validated IDA technique described elsewhere (8-12). It was the first test developed in 1993 employing a hydrophobic membrane as solid phase and was validated by TLC. Briefly, IgG and IgM anti-ganglioside antibodies against a panel of bovine purified gangliosides were detected on a hydrophobic, solvent resistant polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (PVDF-P, Millipore, Saint-Quentin, France). The immobilization of 8 gangliosides (GM3, GM2, GM1, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, and GQ1b), sulfatide, and galactocerebroside (Sigma, St Louis, Mo, USA; Calbiochem, VWR International SAS, France) at 1 µg of each ganglioside and 0.1µg of sulfatide and galactocerebroside in a volume of 1 µL in methanol allowed the detection of a large spectrum of antibodies on the same membrane stripe. The patient and control sera were diluted 1/100 and 1/200 and incubated for 2 hours at 2–8°C while shaking. The secondary antibody, alkaline phosphatase-conjugated F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG and IgM (Jackson Immuno Research Laboratories/Interchim France), was incubated for 1.5 hrs at 2–8°C while shaking. Sigma substrate fast tablets containing nitroblue tetrazolium in a bromochloro-indolylphosphate buffer (NBT/BCIP) were used to detect the enzyme reaction at 25°C. Incubation conditions and times are given in **Table 1**.

Sensitivity and specificity have been determined as reported elsewhere (9).

2-2 Anti-ganglioside antibody immunoline assay from Generic Assays Germany/Labodia France (test 1)

The Anti-GangliosidDot is a line immunoassay used for the qualitative detection of IgG+IgM, IgG or IgM antibodies to gangliosides in serum or plasma. The kit contains 20 numbered strips with a positive control line, bovine sulfatide, 11 highly purified human gangliosides (GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b). All components are ready-for-use except the incubation buffer. 10 µL of the samples are added to 1 mL of sample diluent in each channel containing the strips (final dilution 1:101). Incubation conditions and times are given in **Table 1**. A colored line is scored positive when it is more intense than the corresponding band on the lot-specific evaluation template (cut-off control lines for every ganglioside).

2-3 Anti-ganglioside antibody immunodot assay from Dotzen® Zentec®/Ingen France (test 2)

Dotzen® Ganglio Profile Ab is a IDA for the determination of IgG and IgM or IgG+IgM autoantibodies against 9 gangliosides in human serum including GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b and sulfatide (24 determinations). A sample predilution 1+100 is required, 250 µL of the prediluted samples are added to 1 mL of sample diluent in each channel containing the strips (final dilution 1:501). Incubation conditions and times are given in **Table 1**. Dried and glued strips are interpreted after 30 min by visual examination.

2-4 Anti-ganglioside antibody by immunoline assay: Euroline from Euroimmun /Bioadvance France (test 3)

The Euroline IgM and IgG Ganglioside Profiles 2 allows the determination of up to 7 autoantibodies against GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b and GQ1b (12 determinations). Membrane strips are dotted with individual lines of purified and biochemically characterized antigens. Serum samples diluted 1 to 51 are incubated 60 min at room temperature (RT). Incubation conditions and times are given in **Table 1**. The test strips can be automatically incubated and evaluated using the Euroblot Master system and the EuroLineScan program.

2-5 Anti-ganglioside antibody by ELISA from BÜHLMANN (test 4)

The semi-quantitative GanglioCombi ELISA detects IgG and IgM antibodies against the gangliosides GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b and asialo-GM1. The GanglioCombi is the most frequently employed anti-ganglioside ELISA in France and probably in Europe and provides a specific ganglioside pattern. Patient sera diluted 1 to 51 are incubated for 2 hours at 2-8°C. After washing, antibodies are detected using a monospecific anti-human IgG or an anti-human IgM immunoserum conjugated to horseradish peroxidase. Incubation conditions and times are given in **Table 1**.

The enzyme reaction takes 30 minutes at 18 to 28°C. Results are expressed as the ratio (%) of the sample absorbance to the absorbance of a calibrator containing a high concentration of GM1 autoantibodies. Four significance thresholds have been defined: negative < 30%, grey zone 30% to 50%, positive: 50% to 100%, strongly positive: > 100%.

Methods

The study was conducted in two phases to assess the diagnostic performance of the commercial tests. Firstly, sera with high levels of IgM or IgG anti-ganglioside antibodies were tested to establish IgG and IgM anti-ganglioside antibody profiles. The different profiles were then compared with those obtained to our in-house IDA.

Secondly, one CANOMAD syndrome patient serum with high levels of anti-disialylated gangliosides IgM antibodies was tested at several dilutions to check the robustness and the reproducibility of the commercial tests.

All sera were assessed for anti-ganglioside antibodies according to manufacturers' instructions (**Table 1**). Semi-quantitative determinations were performed by serial dilutions of two sera obtained from a patient with *C. jejuni* infection and AMAN demonstrating IgG > IgM antibodies against GM1 and GD1b and a patient with CANOMAD syndrome showing M-IgM-lambda antibodies against disialylated gangliosides, GD1a, and GM3 (**Fig. 1a/1b**).

The study was approved by the local ethics committee and conducted in accordance with the Helsinki declaration.

Results

1. Test characteristics

Comparing our in-house technique with the commercial immunoassays (**table. 1**), we noticed significant technical differences regarding the ganglioside targets provided. The 4 commercial assays detect antibodies against a panel of 6 to 13 glycolipids including GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, sulfatide, and asialoGM1. The 5 immunodominant gangliosides GM1, GM2, GD1a, GD1b, and GQ1b are included in all tests, while anti-sulfatide antibody testing was offered by 2 manufacturers only (tests 1 and 2). The only ELISA kit detected immunoreactivity against a more limited panel of gangliosides immobilized onto a polystyrene solid phase. All assays were performed at 4°C according to the manufacturer's recommendations with the exception of test 3 running at RT. Final dilutions of patient sera varied from 1/51 to 1/501. Weakly stained bands or spots were not easily interpreted by visual examination particularly regarding test 2. It was difficult to categorize weak dot coloration of test 2 as positive or negative without a cut-off provided by the manufacturer. Based upon our experience, we considered them as negative because normal human serum may contain naturally occurring antibodies against a variety of carbohydrate antigenic determinants, such as GM1. All commercial IDAs had a fast turn-around time and easy handling, especially tests 2 and 3, compared to our time-consuming routine in-house test. Serum predilutions were necessary for tests 2, 3, and 4. Test 3 can be run on an automated reading system for strips, using a scanner and corresponding software. Test 4 gave quantitative results with a cut-off.

We observed some technical issues with tests 2 and 3. The strips of test 2 were not numbered and some antigen spots presented an unusual appearance with a diffuse reaction, comet tails or bull's-eye reactions (the spot appears as a dark peripheral ring) investigating anti-GM1 and anti-GD1b antibodies. The intensity of the coloration was weak compared to test 1 and our in-house-technique. Positive sera run in test 3 gave different results compared to those by our in-house assay. Several lines were absent or the intensity of the coloration was very weak.

2. Test interpretation

As the panel of target antigens differs from one test to another, the results obtained on different panels of glycolipids were difficult to compare. Willison and colleagues (2) suggested that a CANOMAD syndrome patient should present IgM antibodies against GD1b, GD3, GT1b, and GQ1b; although incomplete forms of this immunological profile may occur. As 2 of the 4 commercial assays under evaluation did not cover all these gangliosides, we have considered elevated anti-GQ1b IgM reactivity only as a positive finding in tests 3 and 4. Using the same approach for all the positive samples included in our study, we defined minimal criteria for scoring a positive result (**Table. 3**).

All weak responses with IgM anti-GM1 antibodies were interpreted negative.

3. Semi-quantitative determinations

Two sera, that we routinely use as internal laboratory quality controls were serially diluted and applied for assay comparison. The internal IgG quality control was a serum from a C. jejuni infected patient with motor axonal GBS. The specific profile demonstrated IgG > IgM antibodies against immunodominant GM1 and GD1b (anti-GM1 IgG antibody titer was 1/2000 and anti-GM1 IgM antibody titer was 1/500 with a cut-off <1/100). The immunodominant reactivity to GM1 was observed in none of the commercial tests. The

corresponding reactivities obtained with tests 2 and 3 in particular were very weak or even negative, revealing a weaker coloration of the anti-GM1 dot or line compared with the coloration of the anti-GD1b equivalent.

The internal IgM quality control was a serum from a typical CANOMAD syndrome patient referred to our laboratory. The specific anti-ganglioside antibody profile detected by our in-house test showed very high levels of monoclonal IgM antibodies (IgM-lambda) (titer 1/50 000 with a cut-off < 1/100) against the b-series disialylated gangliosides GQ1b, GT1b, GD1b and GD3 as well as against GD1a and GM3 (a-series gangliosides) (**Fig. 1a**).

The different IgM antibody profiles obtained with the 4 commercial tests are presented in **Figures 1b to 1e** and summarized in **Table 2**. There was a considerable variability in anti-ganglioside reactivity by the commercial assays investigated. Only 2 or 3 anti-gangliosides were identified by tests 3 and 4 in this CANOMAD syndrome sample, whereas test 1 covered almost all the expected anti-ganglioside antibody reactivities (except anti-GM3).

Furthermore, the reproducibility and the robustness of test 2 is not satisfactory; indeed we found defective batches with weak sensitivity (data not shown).

4. Diagnostic performances

In the 33 patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies, all tests identified antibodies against more than one ganglioside, but not necessarily the expected gangliosides. This may reflect non specific responses and the presence of cross-reactive epitopes. The IgG or IgM intensity response against each individual ganglioside was more heterogeneous than expected.

4.1- Sensitivity

In order to compare the diagnostic sensitivity of the tests investigated, we used the minimal criteria for positivity given in **table 3** to assess the anti-ganglioside antibody response. With commercial assays (test 2 and 3), highly specific profiles involving the 4 immunodominant disialylated gangliosides observed in sera from CANOMAD patients were not detected at all. **Figures 2 and 3** show the total number of positive findings for each anti-ganglioside antibody obtained with our in-house assay in comparison with the 4 commercial assays. Test 1 compared to our in-house assay revealed the best detection rate followed by test 4, while tests 2 and 3 suffered from a lack of sensitivity.

In terms of result interpretation (**Table. 4**), using the minimum criteria for a positive finding as defined in **Table 3**, test 1 gave an excellent correlation with our in-house assay. As a matter of fact, test 1 showed 100% consistency indicating very good strength of agreement in accordance with inter-rater agreement statistics (Cohen's $k=1$).

Acceptable results were obtained with test 4, except for the CANOMAD samples. Results of tests 2 and 3 confirmed their lack of sensitivity also for this group of patients.

The commercial tests 1 and 4 were not able to reproduce the predominance of anti-GM1 IgM over anti-GD1b IgM. Using the recommended positivity criteria including a wider range of ganglioside autoantibodies improves the diagnostic accuracy (**Table 4**).

For the semi-quantification of the IgM internal quality control, CANOMAD syndrome specific antibodies were semi-quantified by test 1 and by our in-house method using serial dilutions. At the standard dilution, anti-disialylated ganglioside dots or lines revealed saturated colour intensities.

4.2- Specificity

In the control group, we did not find any positive results, although weak reactions were observed with some samples against sulfatide and GM1 in test 1 (Data not shown). As the anti-GM1 IgM response is considered non-specific, the respective findings were interpreted negative. Thus, the specificity reached 100% for all tests.

Discussion

We tested 12 specific IgG and 21 IgM anti-ganglioside antibody profile positive serum samples identified by our in-house assay in well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies by 4 commercial anti-ganglioside antibody assays.

The specific profiles obtained with the different tests were difficult to compare. We obtained a large heterogeneity of antibody responses against different panels of ganglioside targets. The same antigens present in all tests, GM1, GM2, GQ1b, and GD1a, demonstrated variable antibody reactivity. Thus, several points needed to be considered for the interpretation of specific IgG and IgM antibody profiles in well-defined clinical entities (8-12, 17, 18).

Firstly, in order to facilitate the comparison, we carefully selected sera known to have high levels of specific antibodies as established by our in-house assay and obtained from patients with an unequivocal clinical diagnosis. It is known that anti-glycolipid antibodies have a low affinity compared with anti-peptide antibodies. Consequently, it was easier to obtain an agreement on clearly positive or negative samples in order to maximize the chances of a correct interpretation. Negative results were obtained with low levels of anti-ganglioside antibodies as expected.

Secondly, ganglioside antigenic targets can be coated either on hydrophobic membranes or on polystyrene ELISA plates (19, 20). Disease-specific antibodies presumably recognize gangliosides incorporated in cell membranes and, thus, may fail to bind to gangliosides immobilized on a non-appropriate solid phase. Our anti-ganglioside antibody in-house immunodot employing PVDF membrane as a solid phase appears to provide a more accurate reaction environment for anti-ganglioside antibody assessment compared to ELISA such as discussed for the assessment of similar antibody reactivities to phospholipid antigens (21, 22). Hydrophobic PVDF membranes as solid phases seem to mimic membranous antigen/antibody interactions more efficiently (20-21).

Notably, samples in this study were selected based on positivity for the in-house IDA; therefore, a respective bias cannot be excluded. However, the high performance of our in-house technique has been shown by several studies (8-14).

The closest sensitivity compared with our in-house IDA technique was obtained with test 1. It detects 12 types of antibodies simultaneously under identical conditions: GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, and sulfatide. It has been shown previously that detecting a wide range of ganglioside autoantibodies improves the diagnostic accuracy (17). Moreover, test 1 allows the detection of antibodies against recently discovered novel antigenic determinants (GD2, GM3, GM4). By offering a panel of 6 disialylated gangliosides, this test is also the test of choice for the analysis of samples from patients with CANOMAD syndrome. Tests 1 and 2 were the only methods to offer the detection of anti-GT1a (not included in our own panel). We established in subsequent experiments with test 1 that antibodies against this particular ganglioside could be a valuable marker of rare GBS variants, e.g. the acute paralysis of the oropharyngeal, neck and shoulder muscles (23). Test 1 is also one of the easier to handle and one with a short incubation time among the four tests included in this study. Antigen-band intensity correlates with the antibody titer with a good

ratio of background to positive staining. No background membrane staining was visible. Weakly stained bands were not easily interpreted, thus, a quantitative evaluation has to be developed to measure band intensity in order to facilitate interpretation.

Regarding the specificity of anti-ganglioside antibody testing, we assessed 50 sera of healthy subjects by our in house assay and test 1 (data not shown). Except of low positive findings for anti-GM1 in up to 5% of these sera in particular of the IgM isotype, there was no further false positive response detected for the other anti-ganglioside reactivities in these two assays. This is in accordance with the high specificity of anti-ganglioside antibody detection reported elsewhere (15). The specificities of the other tests need to be determined in a further study.

In conclusion, our findings indicate that specific autoantibody profiles can be detected by validated commercial tests for autoimmune neuropathies using a wide range of glycolipids. Several detected profiles presented even more fine specificities than those observed by our in-house test previously. These specific anti-ganglioside antibody profiles are very useful to define subgroups of patients, particularly if the clinical or electrophysiological diagnosis is not clear.

Despite the enormous effort for standardization of the anti-ganglioside ELISAs made in the early 2000s (24), our data highlight that there is still a need for extensive standardization of all commercial anti-ganglioside assays available. Internal and external reference standards should be established to facilitate standardization. The implementation of national external quality assessment programs will lead to a further improvement in analytical quality.

This work was presented at the 10th Dresden Symposium on autoantibodies, Dresden, September 22-25 2011 (poster)

Conflict of interest: None.

References

- 1- Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 2002; 125:2591-2625.
- 2- Willison HJ, O’Leary CP, Veitch J, et al. The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 2001; 124:1968-77.
- 3- Ilyas AA, Quarles RH, Dalakas MC, et al. Monoclonal IgM in a patient with paraproteinemic polyneuropathy binds to gangliosides containing disialosyl groups. *Ann Neurol* 1985; 18: 655-659.
- 4- Obi T, Kusunoki M, Takatsu, et al. IgM M-protein in a patient with sensory-dominant neuropathy binds preferentially to polysialogangliosides. *Acta Neurol Scand* 1992; 86: 215-218.
- 5- Alaedani A, Latov N. Detection of anti-GM1 ganglioside antibodies in patients with neuropathy by a novel latex agglutination assay. *J Immunoassay* 2000; 21: 377-386.
- 6- Latov N, Alaedani A Detection of anti-glycolipid antibodies by latex agglutination assay. US0049692A1; 2003
- 7- Escande-Beillard N, David MJ, Portoukalian J, Pouget J, Azulay JP et al. A sensitive flow cytometry method for anti-GM1 antibody detection. *J Neurol* 2002; 125: 163-169.
- 8- Chabraoui F, Derrington EA, Mallié-Didier F, et al. Dot-blot immunodetection of antibodies against GM1 and other gangliosides on PVDF-P membrane. *J Immunol Methods* 1993; 165: 225–230.
- 9- Caudie C, Vial C, Bancel J, et al. Measurement of antiganglioside autoantibodies by immunodot-blot assay : clinical importance in peripheral neuropathies. *Ann Biol Clin* 1999; 57: 579-588. French
- 10- Caudie C. Monoclonal IgM autoantibody reactivity in M-IgM peripheral neuropathy. *Clin Rev Allerg Immunol* 2000; 19: 7-18.
- 11- Caudie C, Vial C, Bancel J, et al. Anti-ganglioside antibody profiles in Guillain–Barre syndrome. *Ann Biol Clin Paris* 2002; 60:589–597. French
- 12- Caudie C, Quittard Pinon A, Taravel D, et al. Preceding infections and anti-ganglioside antibody profiles assessed by a dot immunoassay in 306 French Guillain–Barré syndrome patients. *J Neurol* 2011; 258: 6042-9.
- 13- Caudie C, Reymond A, Antoine JC, et al. Screening for anti-glycolipid antibody profiles from patients with immune peripheral neuropathies by Dotzen Ganglio Profile antibodies. *Ann Biol Clin Paris* 2006; 64(2):149–156. French
- 14- Caudie C, Vial C, Petiot P, et al. Serum antibody profiles against gangliosides and sulfatide in peripheral neuropathies: evaluation of a new immunoassay. *Ann Biol Clin Paris* 2010; 68(6):675–680. French
- 15- Conrad K, Schneider H, Ziemssen T, et al. A new line immunoassay for the multiparametric detection of anti-ganglioside autoantibodies in patients with autoimmune peripheral neuropathies. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1109:256–264.

- 16- Ravindranath MH, Morton DL, Graves MC. Factors affecting the fine specificity and sensitivity of serum anti-gangliosides antibodies in ELISA. *J Immunol Methods* 1994;169: 257-272.
- 17- Willison HJ, Veitch J, Swan AV, et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Euro J Neurol* 1999; 6 (1): 71-77.
- 18- Vincent A. Measuring and evaluating the significance of autoantibodies in neurological disorders. *Clin Applied Immunol Rev* 2002; 3: 127-151.
- 19- Willison HJ, Goodyear C, Brennan K, et al. Detection of interactions between lipid complexes and lipid binding agents. WO 001131; 2010
- 20- Willison HJ. The immunology of Guillain Barré syndromes. *J Peripher Nerv Syst* 2005; 10: 94-112.
- 21- Roggenbuck D, Egerer K, von Landenberg P, et al. Antiphospholipid antibody profiling – time for a new technical approach? *Autoimmun Rev* 2012; 11: 821-826.
- 22- Egerer K, Roggenbuck D, Buttner T, et al. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(4):R118.
- 23- Conrad K, Schöbner W, Falk H, et al. Autoantibodies in organ specific autoimmune diseases. A diagnostic reference, editors: Berlin Pabst Science Publishers. 2011:65-69
24. Willison HJ; Veitch J, Swan AV, et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *EuroJNeurol* 1999; 6(1): 71-7

Table 1: Comparison of the main assay characteristics of the 4 commercial anti-ganglioside antibody tests investigated with those of the in-house test

	In-house IDA	Test 1 Generic Assays line-IDA	Test 2 Zentec IDA	Test 3 Euroimmun line-IDA	Test 4 Bühlmann ELISA
Solid phase	membrane	membrane	membrane	membrane	microplate
Sulfatide	yes	yes	yes	no	no
AsialoGM1	no	no	no	no	yes
Galacto-cerebroside	yes	no	no	no	no
Origin of antigen	bovine	human	unknown	unknown	human
Gangliosides (n)	8	11	9	7	5
Spectrum of gangliosides	GM1 GM2 GM3 GD3 GD1a GD1b GT1b GQ1b	GM1 GM2 GM3 GM4 GD1a GD1b GD2 GD3 GT1a GT1b GQ1b	GM1 GM2 GM3 GD3 GD1a GD1b GT1a GT1b GQ1b	GM1 GM2 GM3 GD1a GD1b GT1b GQ1b	GM1 GM2 GD1a GD1b GQ1b
serum dilution	1/101	1/101	1/501	1/51	1/51
temperature	+ 4 °C	+ 4 °C	+ 4 °C	RT	+ 4 °C
serum incubation (h)	2	2	2	1	2
conjugate incubation (h)	1.5	1	1	1	2
conjugate label	alkaline phosphatase	horseradish peroxidase	horseradish peroxidase	alkaline phosphatase	horseradish peroxidase
hands-on time (h)	8	3	<4	<3	5
evaluation	semi-quantitative by dilution	Semi-quantitative by scan program	Qualitative visual reading	Semi-quantitative by scan program	Quantitative OD cut-off

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay IDA: immunodot assay
h: hour, n: number OD: optical density

Table 2: Anti-ganglioside antibody profiles of the IgM-lambda quality control serum (MAI) obtained with the different tests.

test	sulf	GM1	GM2	GM3	GM4	GD1a	GD1b	GD2	GD3	GT1a	GT1b	GQ1b	T	n
In-house	+	0	+/-	++	nd	+++	+++	nd	+++	nd	+++	+++	6	8
Test 1	++	0	0	0	+/-	+/-	+++	+++	+++	+++	++	+++	6	11
Test 2	nd	0	0	0	nd	+/-	++	nd	++	++	+	++	5*	9
Test 3	+	0	0	0	nd	0	++	nd	nd	nd	+/-	++	2	7
Test 4	nd	0	0	nd	nd	+	+++	nd	nd	nd	nd	+++	3	5

0: negative, +/-: equivocal, +: positive, ++: strong positive, +++ Very strong positive

nd: not detected

T: Total of positive gangliosides

n: number of gangliosides for each technique (sulfatides are not counted)

*: Reproducibility is not satisfactory; differences between batches were observed.

Table 3: Recommended and minimal criteria used in the study for a positive anti-ganglioside antibody finding in a patient serum

Clinical diagnosis	Recommended positivity criteria ^{1, 2, 9,12, 23}	Minimal positivity criteria *
GBS with ophthalmoplegia	GQ1b and additional GD1a /GT1a/GT1b IgG	GQ1b IgG
GBS: AMAN	GM1 ,GD1a and additional GT1a/ GT1b IgG	GM1 and GD1a IgG
GBS : AMSAN	GM1, GD1a,GD1b and GT1a/GT1b IgG	GM1, GD1a and GD1b IgG
MFS	GT1a and GQ1b IgG	GQ1b IgG
GBS post CMV infection	GM2 IgM	GM2 IgM
M-IgM chronic motor peripheral neuropathy	GM1 and GD1b	High levels of GM1 with M-IgM
CANOMAD	GD1b, GD3, GT1b, GQ1bIgM ²	High levels of antibodies: GQ1b IgM and one disialylated gangliosides between: GD1b,GD2,GD3, GT1a , GT1b IgM
MMN	GM1 and GD1b IgM	GM1 IgM

*: Minimal criteria are based on basic profiles including 5 immunodominant gangliosides.

Table 4: Specific antibody profiles obtained in 15 patients with acute peripheral neuropathies and 18 patients with chronic peripheral neuropathies as obtained by our in-house immunodot assay and by 4 commercial assays.

Immune-mediated peripheral neuropathies	Number of samples	Anti-ganglioside autoantibody profiles detected by in-house immunodot	Number of positive samples using minimal positivity criteria*					Number of positive samples using recommended positivity criteria				
			Ih T	T1	T2	T3	T4	Ih T	T1	T2	T3	T4
AMAN and AMSAN	6	IgG antibodies against GM1>GD1b	6	6	3	1	6	6	6	3	1	6
Miller Fisher syndrome	4	IgG antibodies against GQ1b	4	4	2	3	3	0	4	1	0	0
GBS with ophthalmoplegia	1	IgG antibodies against GD1a, GQ1b	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
GBS with ophthalmoplegia	1	IgG antibodies against GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
GBS post CMV	2	IgM antibodies against GM2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
GBS Axonal motor post CJ	1	IgG and IgM antibodies against GM1 and GD1b	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
Total of acute PN	15		15	15	7	6	13	10	15	6	3	9
CANOMAD syndrome	12	M-IgM antibodies against GD1b, GD3, GT1b, GQ1b	12	12	6	5	7	12	10	3	0	0
Chronic motor neuropathy	3	M-IgM antibodies against GM1 and GD1b	3	3	2	1	3	3	3	2	1	3
Chronic motor neuropathy with lymphoma	1	M-IgM antibodies against GD1a and GT1b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Chronic sensory neuropathy	1	M-IgM antibodies against sulfatides>GD1b>GM1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MMN	1	IgM antibodies against GM1>GD1b	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Total of chronic PN	18		18	18	10	8	13	18	15	7	3	6
Total of PN	33		33	33	17	14	26	28	30	14	9	15

AMAN: acute motor axonal neuropathy

AMSAN: acute motor and sensory axonal neuropathy

CANOMAD: Chronic Ataxic Neuropathy Ophthalmoplegia IgM-paraprotein cold Agglutinins Disialosyl Antibodies

CMV: cytomegalovirus

CJ: Campylobacter jejuni

GBS: Guillain-Barré syndrome

M-IgM: Monoclonal IgM

MMN: multifocal motor neuropathy with conduction blocks

PN: peripheral neuropathies

IhT: In-house Test

T: Test

*: The 5 immunodominant gangliosides present on each test are GM1; GM2; GD1a; GD1b and GQ1b.

Figures 1a-1e: IgM internal quality control serum tested by each immunoassay.

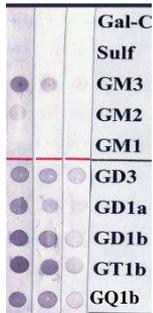


Figure 1a: IgM internal quality control serum tested by our in-house test diluted at 1/1000, 1/10 000 and 1/50 000. High IgM antibody response was detected against GD3, GD1b, GT1b, GQ1b, GD1a, and GM3 with a very weak additional antibody response against GM2. No antibody was detected against sulfatide. The CANOMAD profile was well identified until the 1/50 000 dilution.

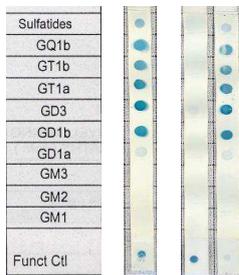


Figure 1b: IgM internal quality control serum tested by the anti-ganglioside IgM+IgG, IgG, and IgM detecting IDA variants from Zentec, respectively from left to right. The CANOMAD profile obtained was a strong IgM response against GD1b, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, weak response against GD1a, and sulfatide. No antibody against GM3 was detected.

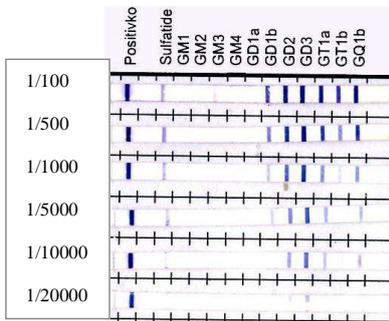


Figure 1c: IgM internal quality control (MAI) serum tested by Generic Assays' line-IDA diluted at 1/100, 1/500 1/1000, 1/5000, 1/10 000 and 1/20 000 The CANOMAD profile is IgM against GD1b, GD2, GD3, GT1a; GT1b, GQ1b and sulfatide. No antibody was detected against GD1a. There was a very weak antibody response against GM3. The CANOMAD profile was well identified till the 1/10 000 dilution.

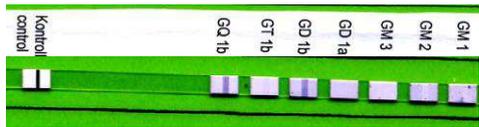


Figure 1d: IgM intra-laboratory quality control serum tested by Euroimmun's line-IDA with Euroline scan system. The CANOMAD profile detected was IgM against GD1b (titer 35) and GQ1b (titer 32, cut-off < 5). No antibody response was detected against GD1a and GM3.

Ganglioside	OD	Ratio	
GA1	108	6	negative
GM1	79	4	negative
GM2	219	12	negative
GD1a	1728	98	positive
GD1b	3464	197	strong positive
GQ1b	3638	207	strong positive

Figure 1e: IgM internal quality control serum tested with the GanglioCombi ELISA from BÜHLMANN. The CANOMAD profile detected was IgM against the 2 immunodominant disialylated gangliosides GD1b and GQ1b and an antibody response against GD1a (cut-off 50)

OD: optical density

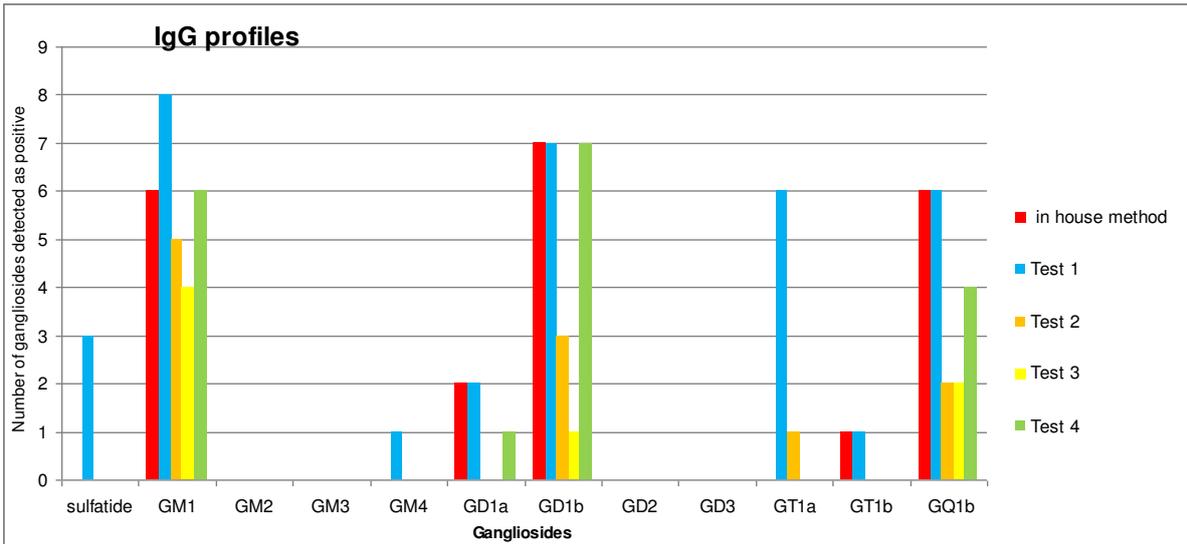


Figure 2: Number of positive anti-ganglioside IgG reactivities obtained for the 12 IgG profile positive samples

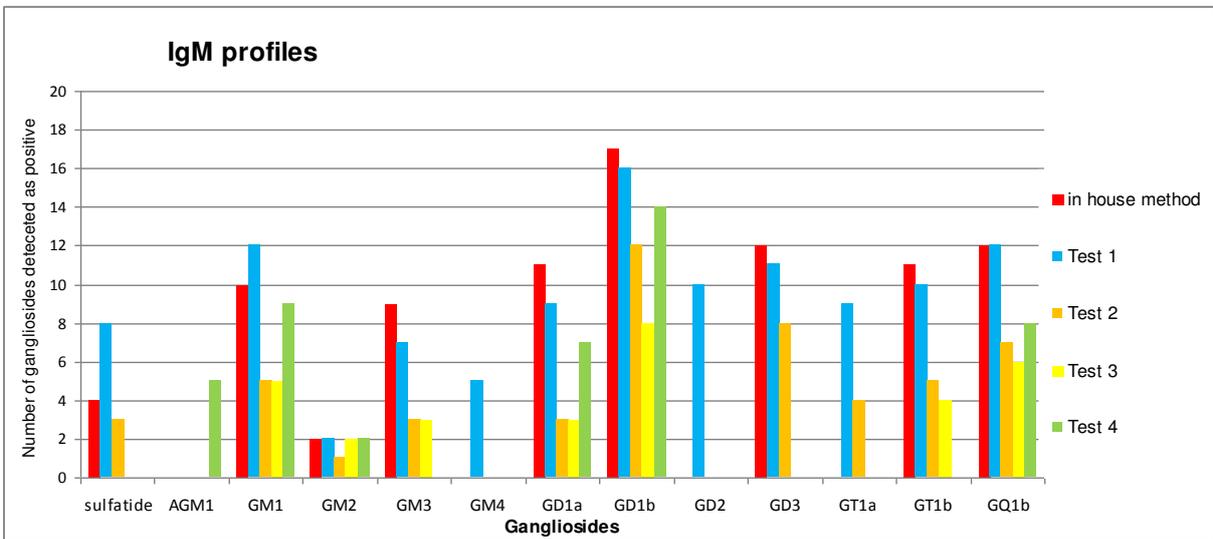


Figure 3: Number of positive anti-ganglioside IgM reactivities obtained for the 21 IgM profile positive samples

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : M

ISPB - FACULTE DE PHARMACIE

CONCLUSION

Dans le cadre du diagnostic de neuropathies périphériques auto-immunes pouvant bénéficier de traitements à visée immunologique, la mise en évidence des autoanticorps anti-gangliosides est très utile.

La détection des différents profils permet de distinguer en fonction de la classe des anticorps, des pathologies aiguës de type syndrome de Guillain-Barré ainsi que les variants (AMAN, AMSAN, SMF) ou des pathologies chroniques de type NMMBC, motrices pures, ou encore associées à une IgM monoclonale (sensitives de type CANOMAD).

La mise sur le marché de nouveaux tests commerciaux pour remplacer la technique « maison » soulève des questions pour le biologiste quant au choix du test à utiliser pour un diagnostic optimisé.

Le but de notre travail a été de comparer et d'évaluer les performances analytiques et diagnostiques de 4 tests diagnostiques présents sur le marché : Generic Assays/Labodia: Anti-Gangliosid Dot¹, Zentec/Ingen: Dotzen®² Ganglio Profile Ab, Euroimmun/BioAdvance: Euroline ganglioprofile³ et Bühlmann: GanglioCombi®⁴

Nous avons analysé 33 sérums de neuropathies auto-immunes bien documentés sur le plan clinique, électrophysiologique et biologique, issus de la sérothèque du laboratoire, présentant un profil anticorps anti-gangliosides caractéristique, 12 profils de classe IgG, 21 de classe IgM et 10 neuropathies contrôles avec anticorps négatifs.

Les réponses des profils IgG et IgM ont été plus hétérogènes qu'attendu avec une sensibilité variant de 30 à 100% selon les tests.

Le test 1 Generic Assays présente les performances les plus satisfaisantes. Sur le plan analytique, il présente la meilleure praticabilité et le plus large panel de gangliosides. Sur le plan diagnostique, il présente la meilleure sensibilité et la plus grande concordance de résultats avec la technique d'immunodot maison.

Des améliorations en terme de praticabilité, de sensibilité et de contrôle qualité ont été proposées pour chacun des 4 tests à la suite de ce travail.

Cette étude a été présentée sous forme d'un poster au 10e congrès international d'auto-immunité de Dresde en 2011. Un article a été récemment soumis pour publication à la revue Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).

Le Président de la thèse,
Nom :

Signature :

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeure C. VINCIGUERRA

L'ISPB – Faculté de pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

QUITTARD-PINON Arnaud

Détection des autoanticorps anti-gangliosides associés aux neuropathies périphériques auto-immunes : évaluation de 4 tests commerciaux

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2012, 89 p.

RESUME

Les profils autoanticorps anti-gangliosides sont utilisés comme biomarqueurs spécifiques dans le diagnostic des neuropathies périphériques autoimmunes qui sont soit aiguës : le syndrome de Guillain-Barré (SGB) et ses variants immunocliniques, soit chroniques, incluant la neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction et les neuropathies associées à une gammopathie monoclonale IgM avec le syndrome CANOMAD. Nous avons analysé 33 sérums de neuropathies autoimmunes bien documentés sur le plan clinique, électrophysiologique et biologique, issus de la sérothèque du laboratoire, présentant un profil anticorps anti-gangliosides caractéristique, 12 profils de classe IgG, 21 de classe IgM et 10 neuropathies contrôles avec anticorps négatifs. Nous avons évalué les performances analytiques (praticabilité) et diagnostiques (sensibilité, spécificité) des 4 tests commerciaux actuellement sur le marché, 3 tests en immunodot : (Generic Assays/Labodia: Anti-Gangliosid Dot, Zentec/Ingen: Dotzen® Ganglio Profile Ab, Euroimmun/BioAdvance: Euroline ganglioprofile) et 1 test ELISA (Bühlmann: GanglioCombi®). Sur le plan analytique, le nombre de gangliosides disponible varie de 6 à 12 rendant l'interprétation des profils difficile. Le test 1 de Generic Assays présente la meilleure praticabilité et le plus large panel de gangliosides (12). Sur le plan diagnostique, la sensibilité des tests varie de 30% à 100%. La spécificité des tests est proche de 100% car toute réponse faiblement positive a été interprétée comme négative.

Le test 1 présente la meilleure sensibilité et la plus grande concordance de résultats selon la technique d'immunodot maison.

Des améliorations en termes de praticabilité, de sensibilité et de contrôle qualité ont été proposées pour chacun des 4 tests.

Ce travail a été présenté sous forme d'un poster au 10e congrès international d'auto-immunité de Dresde en 2011. Un article a été récemment soumis à la revue Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) pour publication.

MOTS CLES

Evaluation
Neuropathies périphériques
Autoanticorps anti-gangliosides
Immunodot

JURY

M. Bienvenu Jacques, Professeur d'immunologie
Mme Caudie Christiane, Docteur ès sciences pharmaceutiques
M. Vial Christophe, Docteur en médecine

DATE DE SOUTENANCE

Mardi 16 octobre 2012

ADRESSE DE L'AUTEUR

111 rue Massena, 69006 Lyon