



LES ANTICORPS ANTI-GANGLIOSIDES : Intérêts et limites dans les neuropathies périphériques autoimmunes

Sophie Hüe
CHU Henri Mondor

Françoise Fortenfant
CHU Toulouse

Neuropathies périphériques

- Mononeuropathie:
 - Atteinte d'un tronc nerveux
 - Ex: sciatalgie, cruralgie, névralgie cervico-brachiale
- Mononeuropathie multiple
 - Atteinte de plusieurs troncs nerveux de façon asymétrique et asynchrone
- Polyneuropathie:
 - Atteinte de toutes les fibres nerveuses, en fonction de leur longueur (atteinte longueur-dépendante)
 - Atteinte distale symétrique sensitive et/ou motrice
 - Axonale (petites fibres)
 - Démyélinisante (grosses fibres)
- Polyradiculonévrite:
 - Atteinte de l'ensemble des racines nerveuses sensibles et motrices et des troncs nerveux
 - Ex: syndrome de Guillain-Barré (SGB)
- Neuronopathie:
 - Atteinte du corps cellulaire du neurone (moteur ou sensitif)

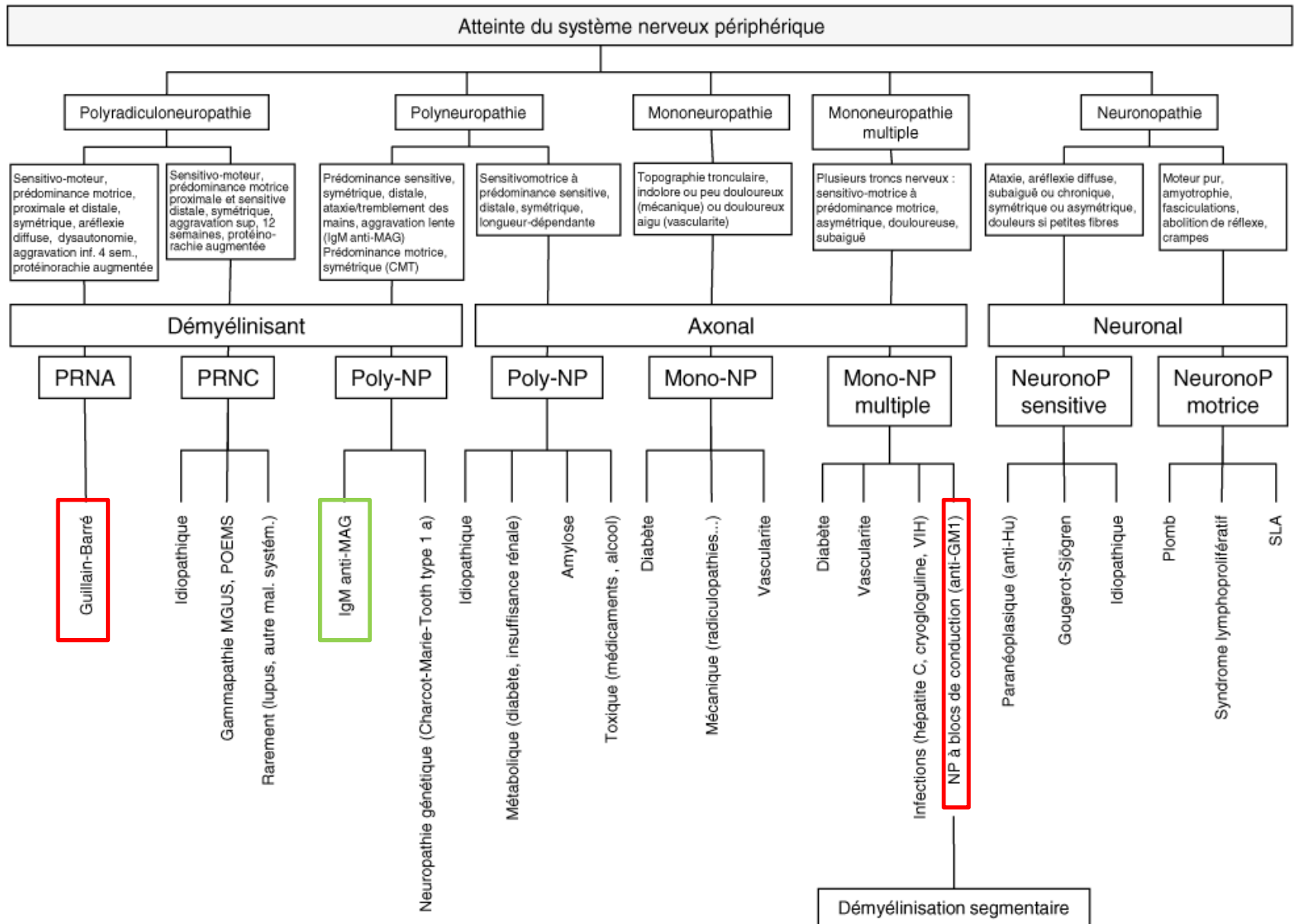
Diagnostic

- Clinique:
 - Signes moteurs (paralysie ou parésie, amyotrophie, fasciculations, diminution ou abolition des ROT...)
 - Signes sensitifs (paresthésies, dysesthésies, douleurs, pertes de sensibilité, troubles de l'équilibre..)
 - Signes neurovégétatifs (signes vasomoteurs, troubles trophiques et des phanères, hypotension orthostatique...)
- Installation des troubles:
 - Aigue (en moins de 4 semaines): SGB, vascularites
 - Subaiguë: paranéoplasique, lymphome
 - Chronique (en plus de 12 semaines) : PIDC, neuropathies héréditaires

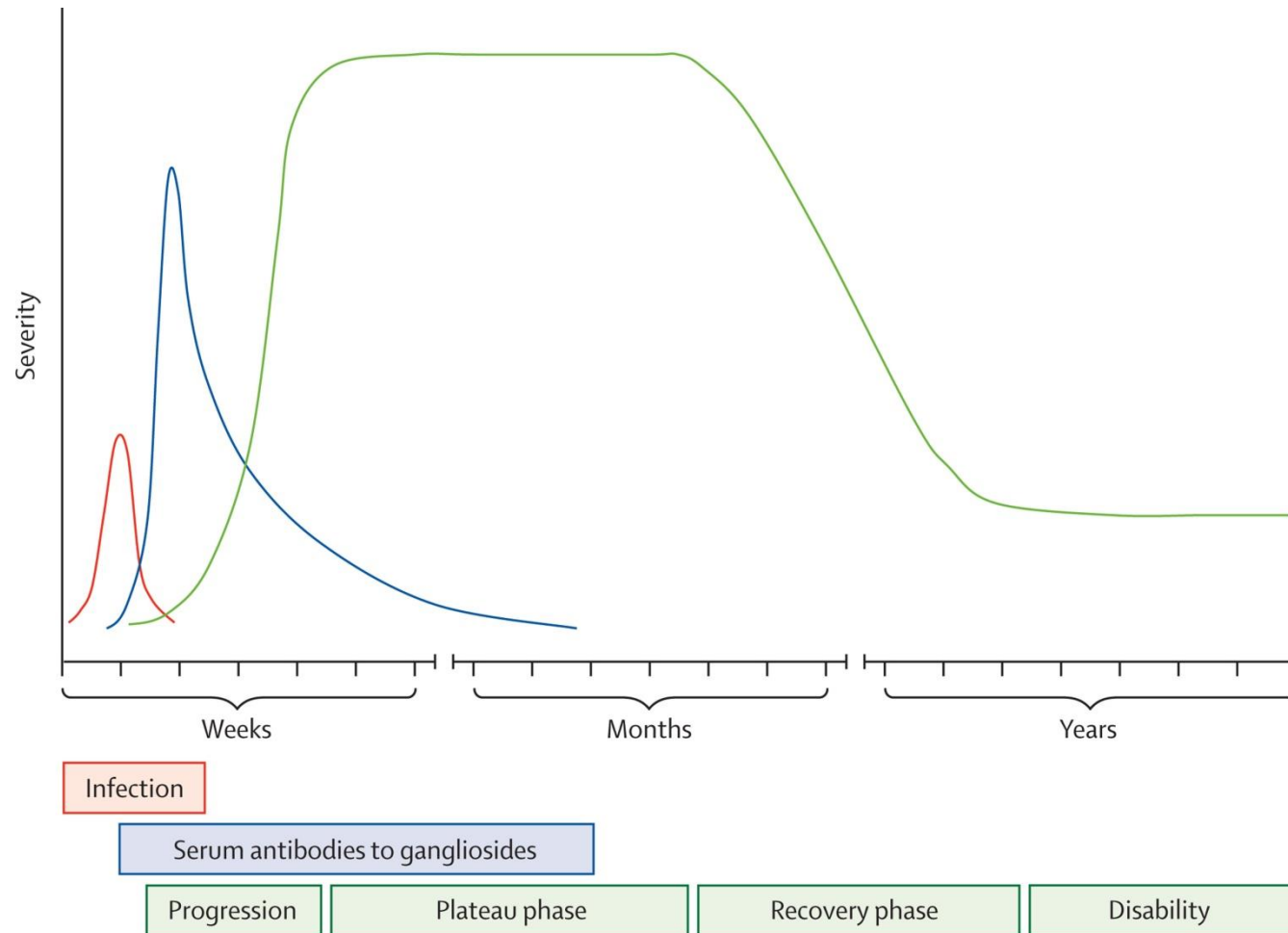
Orientation étiologique

- Electroneuromyographie (ENMG)
 - Confirme la nature neurogène du trouble
 - Détermine le mécanisme démyélinisant, axonal ou neuronal
- Glycémie à jeun (recherche d'un diabète)
- Numération formule sanguine (recherche d'une anémie, d'une macrocytose, d'une hémopathie maligne)
- γ -GT, VGM (recherche d'une consommation problématique d'alcool)
- Transaminases (recherche d'une hépatite)
- CRP-VS (recherche d'un syndrome inflammatoire, d'une hémopathie maligne)
- Créatininémie et DFG (recherche d'une insuffisance rénale)
- Thyréostimuline hypophysaire (TSH) (recherche d'une hypothyroïdie)
- Immunofixation des immunoglobulines du sérum à la recherche d'une gammopathie monoclonale
- Sérologies virales: hépatites B et C, HIV, Lyme
- Bilan immunologique: AAN, ANCA, FR, cryoglobulinémie

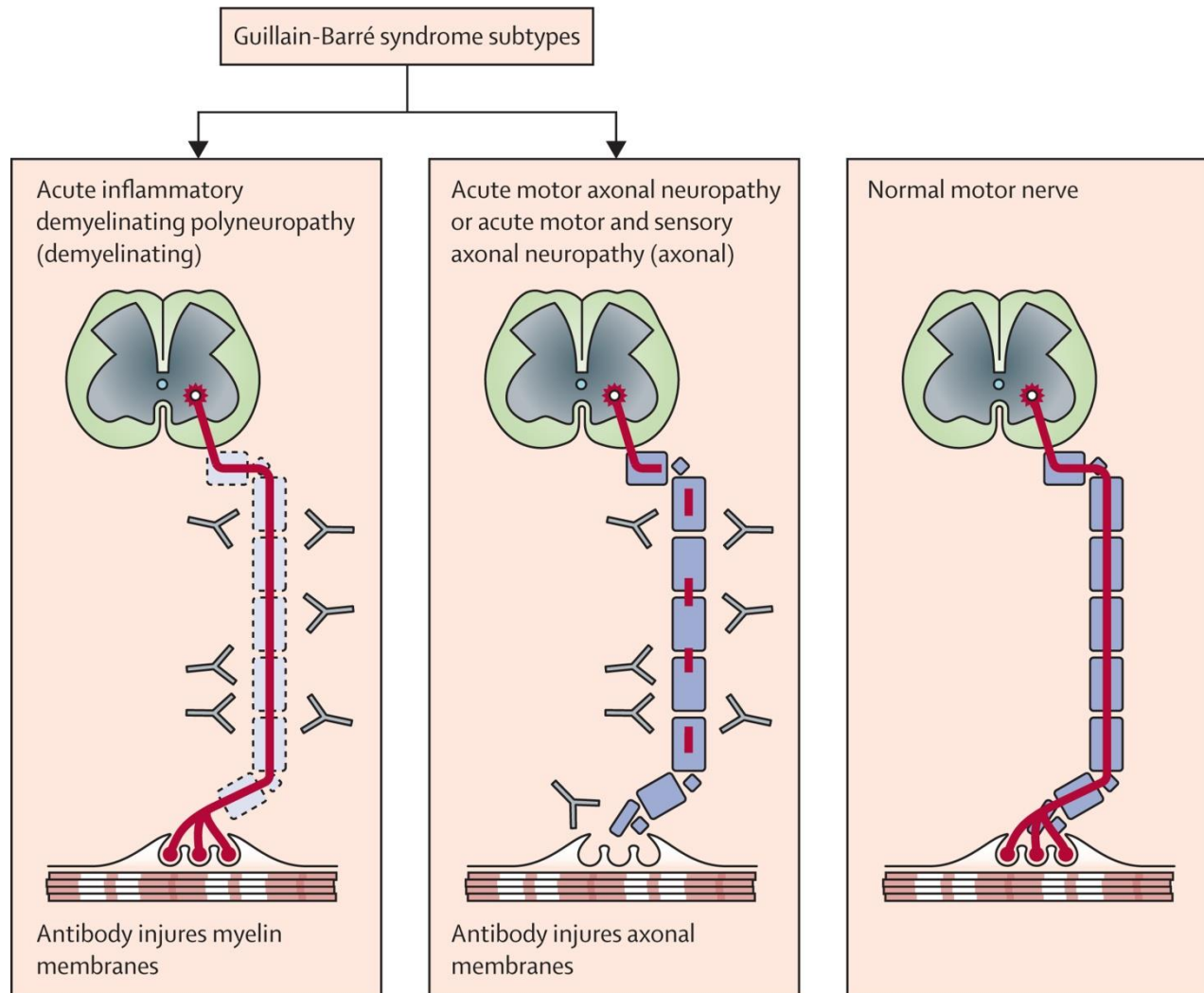
Diagnostic des NP



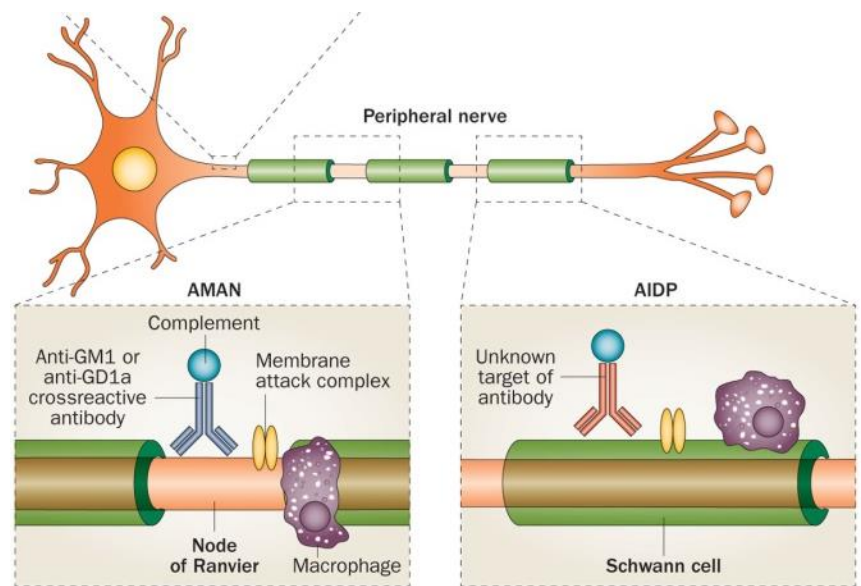
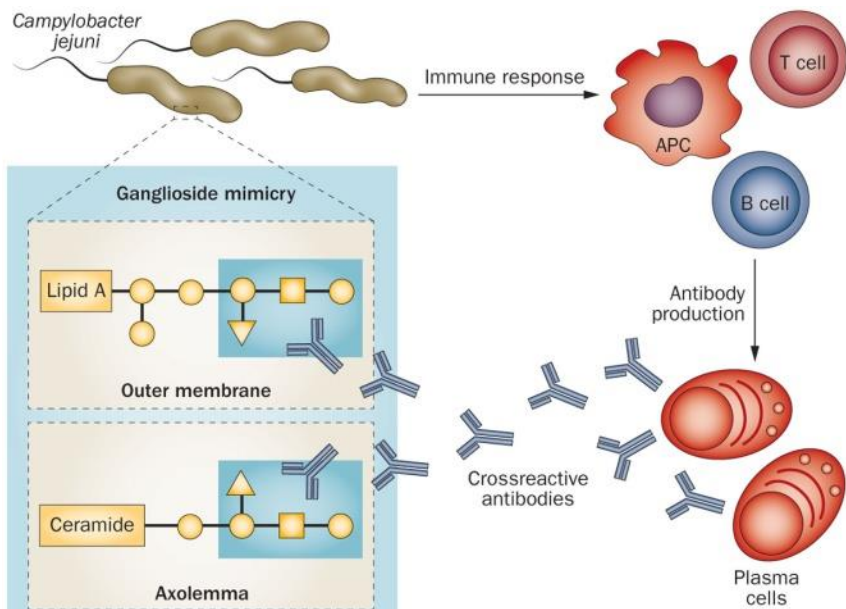
Syndrome de Guillain Barré



Deux grandes formes de SGB: forme démyélinisante et forme axonale

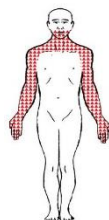
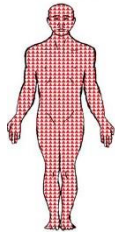


Immunopathologie des SGB: mimétisme moléculaire et Ac anti-gangliosides

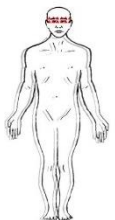


Différentes formes de SGB

Classic Guillain-Barré syndrome (GBS)



Miller Fisher syndrome



Sous-types de SGB	Manifestations cliniques majeures	Anticorps
AIDP (acute inflammatory demyelinating polyneuropathy)	SGB sensitivomoteur, souvent associé avec des déficits nerveux crâniens et dysfonction neurovégétatif fréquent	aucun
AMAN (acute motor axonal neuropathy)	SGB moteur pur	IgG GM1, GD1a
AMSAN (acute motor sensory axonal neuropathy)	AMAN sévère avec atteinte des fibres sensibles conduisant à des déficits sensitifs	IgG GD1a, GM1
Déficit pharyngo-cervico-brachial	Faiblesse prédominante des muscles oropharyngaux, de la face du cou et des épaules	IgG GT1a, GQ1b
MFS (syndrome Miller Fisher)	Ataxie, ophtalmoplégie externe, aréflexie	IgG GQ1b, GT1a
Encéphalite de Bickerstaff	Ataxie, ophtalmoplégie externe, hypersomnolence	IgG GQ1b
SGB ataxiant	Forme sensitive pure avec ataxie sévère	IgG GD1b, GM3

NP auto-immunes chroniques

NP auto-immunes chroniques	Manifestations cliniques majeures	Anticorps
CIDP (polyneuropathie démyélinisante inflammatoire chronique)	Dysfonction motrice et sensitive au niveau de plus d'une extrémité, d'évolution progressive ou par poussées pendant plus de deux mois	Aucun
MMN (neuropathie motrice multifocale à bloc de conduction)	Déficit moteur pur asymétrique, multifocal, débutant et prédominant aux membres supérieurs, et d'évolution chronique. Peut mimer une maladie du motoneurone inférieur (type SLA)	IgM anti-GM1 IgM anti-GM1 et GD1b IgM anti-GM1 et GM2
CANOMAD (chronic ataxic neuropathy, ophthalmoplegia, IgM paraprotein, cold agglutinins, disialosyl ganglioside antibodies)	Neuropathie sensitive ataxiante avec atteinte du tronc cérébral (diplopie, ptosis, dysphagie, dysarthrie)	Gammopathie monoclonale IgM contre des gangliosides disialylés GD1b, GD3, GD2, GT1a, GT1b, GQ1b

Etude CHU Mondor

Clinical diagnosis	Typical Immunologic profile	Patients (n=22)
Guillain-Barré syndrome (GBS)		
– Acute inflammatory demyelinating polyneuropathy	None	5
– Acute motor axonal neuropathy (AMAN)	GM1 , GD1a IgG	2
– Paraplegic AMAN	GM1, GD1a IgG	4
– Ataxic GBS	GD1b IgG	1
– Miller Fisher syndrome	GQ1b IgG	1
Chronic multifocal motor neuropathy with conduction block	GM1 IgM	4
Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy	None	3
CANOMAD	GD1b, GD3, GT1b, GQ1b IgM	2

Résultats

	ELISA	Dot n°1	Dot n° 2	Dot n°3	P value
Expected Positivities	14	12	9	9	0.75
Expected Negativities	4	5	4	6	
Confirmed diagnostic	17	15	12	12	0.2
Error diagnostics	5	7	10	10	
Sensitivity	78%	67%	50%	50%	0.24

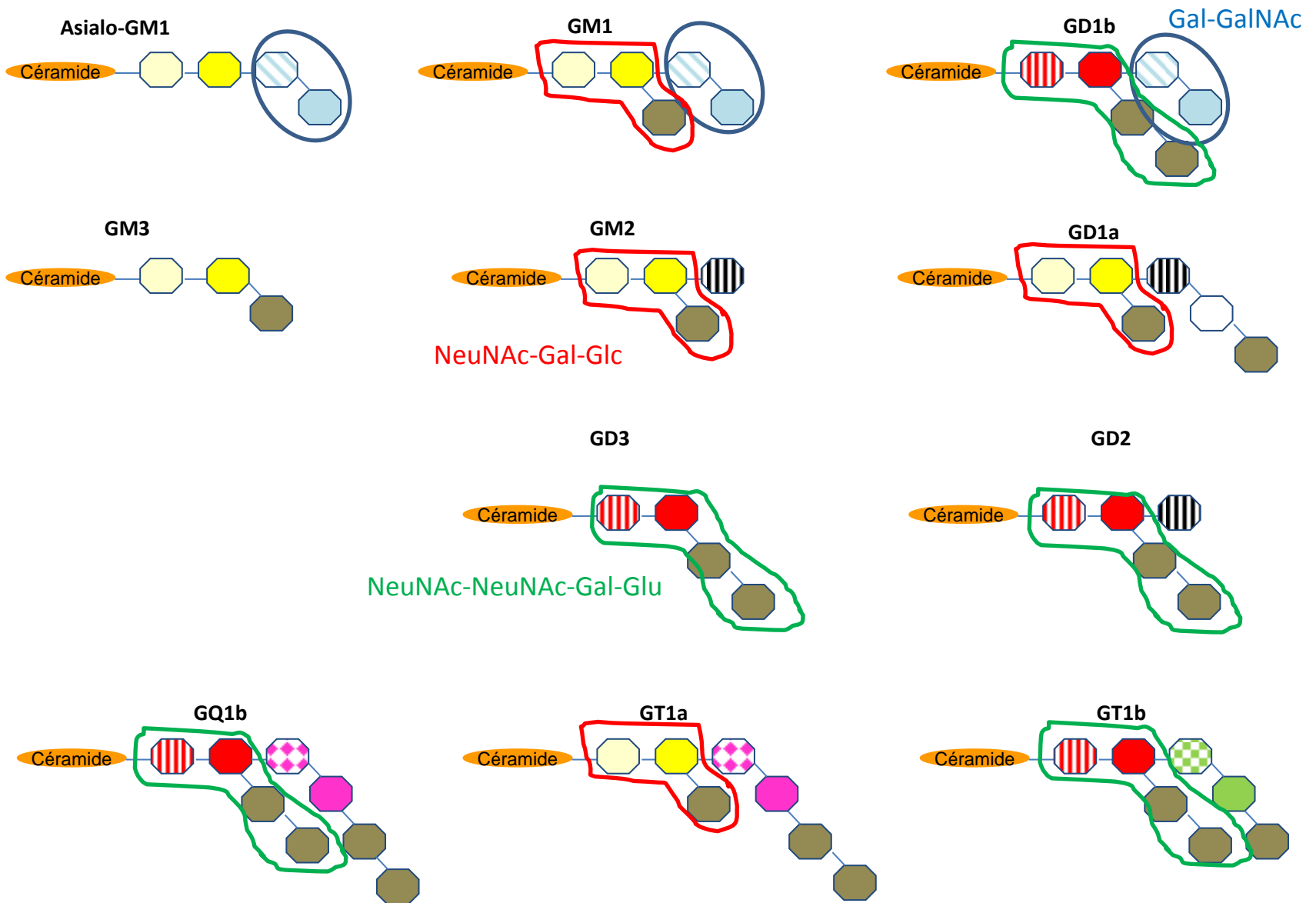
Nomenclature

Svennerholm

(IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1977 ; Svennerholm, 1985)

- **G** : ganglioside
- **M, D, T** : nombre d'acide sialique
- **Le chiffre** : nombre d'oses compris dans la structure du ganglioside.
- **Lettre** :
 - **a** : un seul acide sialique sur le galactose interne
 - **b** : un groupement disialylé branché sur ce galactose interne
 - **c** : trisialylés

Groupes de gangliosides fonction de similarités structurelles

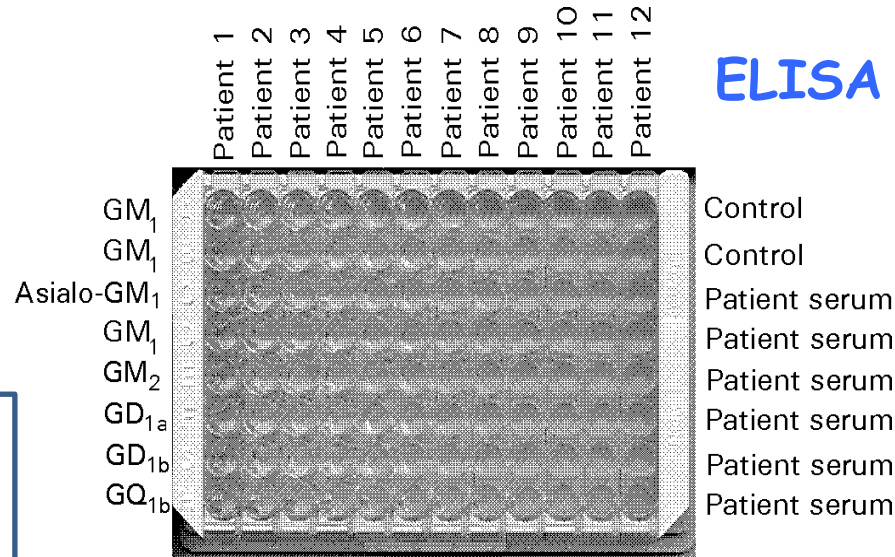
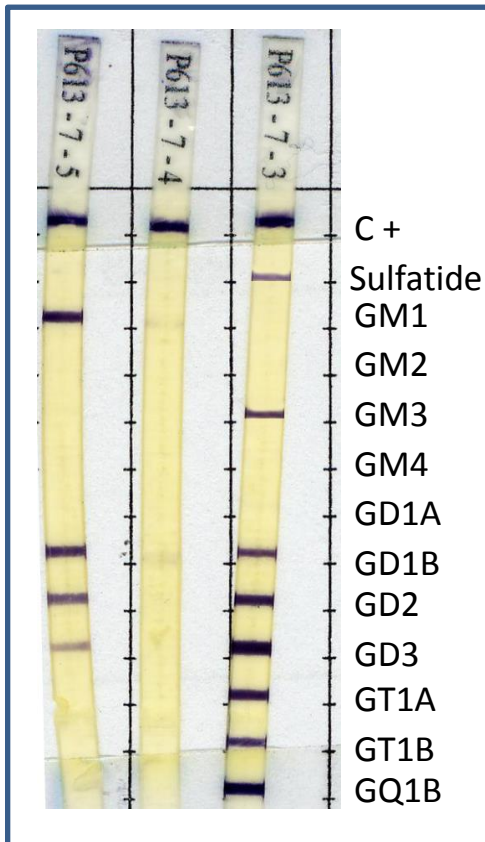


Techniques de détection

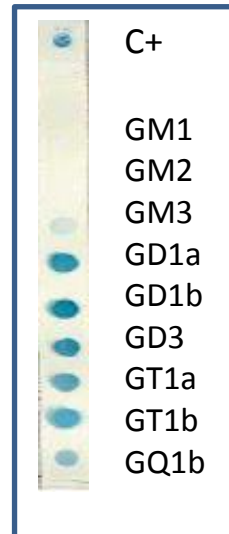
- **Milieu : SERUM** aucun intérêt dans d'autres liquides biologiques.
- **Ac : monoclonaux ou polyclonaux.**
- **Isotypes** : IgM : pathologies chroniques / IgG : formes aiguës.
- **Techniques :**
 - Historique et de référence : chromatographie en couche mince sur gel de silice à partir de gangliosides bovins.
 - En routine actuellement : immunodot, ELISA
- **Dépistage** anti-IgG + anti-IgM, puis **identification** avec conjugués séparés
- **Profil d'anticorps** anti-gangliosides d'isotype IgG et IgM
 - correspondance avec des syndromes cliniques définis
 - **Mais** : réactions croisées, problèmes ...

Les techniques commerciales

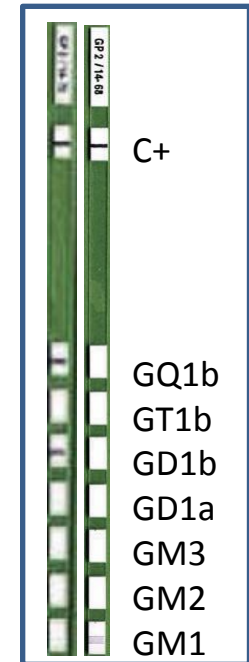
Immunodot 1



Immunodot 2



Immunodot 3



EEQ

Réponse attendue : IgM anti anti-GM1 et anti-GD1b

IgG	GM1		GM2		GD1a		GD1b		GD1b	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
	1	34	0	30	0	31	0	33	0	34
	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10
	0	16	0	12	0	13	0	15	0	16
	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6
	8	9	0	12	1	11	8	3	0	15
	2	4	0	5	0	5	1	2	0	6
	6	5	0	7	1	6	7	1	0	9

IgM	GM1		GM2		GD1a		GD1b		GD1b	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
	26	8	0	29	1	27	9	26	0	30
	2	0	0	1	0	1	2	0	0	1
	12	0	0	10	0	10	7	5	0	10
	6	8	0	12	1	10	0	15	0	13
	6	0	0	6	0	6	0	6	0	6
	16	1	0	12	3	9	11	1	0	12
	6	0	0	5	1	4	4	0	0	4
	10	1	0	7	2	5	7	1	0	8

IgG/IgM Screen	GM1		GM2		GD1a		GD1b		GD1b	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
	6	0	0	6	0	6	2	4	0	6
	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
	3	0	0	3	0	3	1	2	0	3
	2	0	0	2	0	2	0	2	0	2
	6	0	0	3	1	3	3	0	0	5
	3	0	0	1	0	2	1	0	0	3
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	2	1	1	2	0	0	2

Comparison of Commercial Tests for Detecting Multiple Anti-Ganglioside Autoantibodies in Patients with

CHRISTIANE CAUDIE¹, ARNAUD QUITTARD PINON¹, FRANÇOISE BOUHOUR², CHRISTOPHE VIAL², LORNA GARNIER¹, NICOLE FABIEN¹

Well-Characterized Immune-Mediated Peripheral Neuropathies

Clin. Lab. 2013;59:1277-1287

	In-house IDA	Test 1 Generic Assays line-IDA	Test 2 Zentec Line- 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 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 (hours)	2	2	2	1	2
Conjugate Incubation (hours)	1.5	1	1	1	2
Conjugate label	alkaline phosphatase	horseradish peroxidase	horseradish peroxidase	alkaline phosphatase	horseradish peroxidase
Hands-on time (hours)	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, n - number, OD - optical density.

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 GMI > 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 infection	2	IgM antibodies against GM2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Axonal motor GBS post CJ infection	1	IgG and IgM antibodies against GMI 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 GMI 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 > GMI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MMN	1	IgM antibodies against GMI > 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

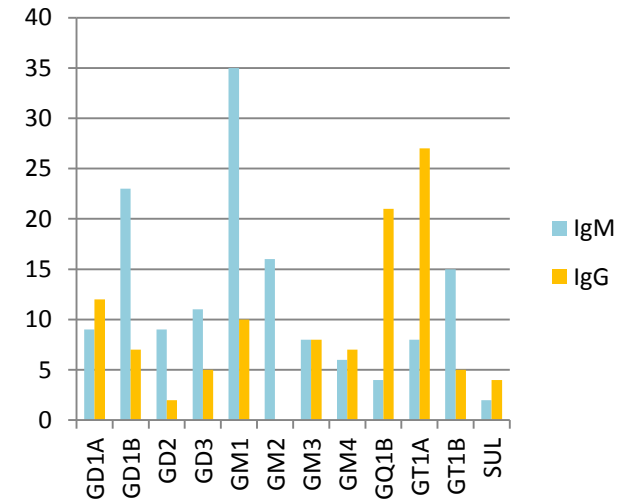
Problèmes rencontrés

- **Evaluation externe de la qualité**
 - Bonne pour bande de forte intensité
 - Variabilité +++ de résultats avec des bandes de faible ou moyenne intensité.
- **Les comparaisons inter-techniques publiées : performances analytiques très hétérogènes**
- **Des profils incomplets ou non typiques** sont observés sur des demandes de routine

Etude CHU Toulouse

- Etude rétrospective sur 3 ans en routine : 640 demandes
- Positifs : 18% des demandes (118 profils : 58 d'IgG, 63 d'IgM).
- Certains Ac anti-gangliosides sont peu représentés (anti-GD1a), d'autres très fréquents (anti-GQ1b, anti-GT1a et anti-GM1)
- Les profils avec IgG
 - anti-GQ1b : clinique attendue dans 70% des cas. IgG anti-GT1a sont souvent associés à l'Ac anti-GQ1b et correspondent à des MFS ou apparentés, sans atteinte bulbaire signalée.
 - profils anti-GD1A +/- anti-GM1 et les profils à anti-GD1b : corrélation bioclinique est généralement bonne.
 - profils avec IgG anti-GM1, -GM3 ou -GM4 isolé : clinique non typique dans 50% des cas.
- Les profils d'IgM,
 - IgM anti-GM1 +/- GD1b et neuropathies motrices multifocales avec bloc de conduction dans 89% des cas
 - Les profils avec Ac anti-gangliosides disialylés sont le plus souvent associés à un diagnostic de CANOMAD (mais, le plus souvent, ni cryoglobuline, ni gammopathie monoclonale)
 - quelques cas avec des profils IgM d'Ac anti-gangliosides non typiques : dans la moitié des cas, neuropathies dysimmunitaires mal caractérisées ou SGB en rechute ou en suivi.

	IgM	IgG
GD1A	9	12
GD1B	23	7
GD2	9	2
GD3	11	5
GM1	35	10
GM2	16	0
GM3	8	8
GM4	6	7
GQ1B	4	21
GT1A	8	27
GT1B	15	5
SUL	2	4



Éléments d'explication

- **Ac naturels** : 10 à 20% de la population générale
- **La sensibilité de ces anticorps est variable.**
 - Relativement forte pour certains
 - (IgG anti-GQ1b dans 83% des SMF et 68% des encéphalites de Bickerschaft)
 - Varie fortement selon les études pour d'autres
 - (IgM anti-GM1 et/ou GD1b entre 20 et 85% dans neuropathies motrices multifocales à blocs de conduction)
 - Fréquence proche de celle dans la population générale
 - (polyneuropathie aiguë démyélinisante : négatif ou IgM anti-GM1 ou GD1b dans 20% des cas)
- **Spécificité des anti-gangliosides**

SLA

- SLA au début : diagnostic différentiel difficile avec neuropathie motrice multifocale
- Publication avril 2015
 - Technique ELISA Bühlman
 - Sur 84 SLA : 26.2% de positifs (22 sérums)
 - 10.7% positif IgG (GD1a, GD1b, GQ1b)
 - 17.9% positifs IgM (GM1, GD1b)
 - 200 Sujets sains : 27.5% de positifs
 - 15.5% IgG et 14.5% IgM (5 IgG+IgM)
 - Valeurs fortes chez 3.5%
 - Pas de différence significative avec groupe des SLA
 - Mêmes types de gangliosides cible des positifs
- A Toulouse

Anti-Ganglioside Antibodies in Amyotrophic Lateral Sclerosis Revisited

Katja Kollwe^{1*}, Ulrich Wurster¹, Thomas Sinzenich¹, Sonja Körner¹, Reinhard Dengler¹, Bahram Mohammad^{2,3}, Susanne Petri¹

¹ Department of Neurology, Medical School Hannover, Hannover, Germany, ² Department of Neurology, University of Lübeck, Lübeck, Germany, ³ CNS-LAB, International Neuroscience Institute, Hannover, Germany

Diagnostic	IgG	IgM
SLA	GM1 GD1B	
SLA avec atteinte bulbaire	GD1A GD3	
SLA	GT1A	
SLA		GD2
SLA familiale	GM3	

Intérêt des anti-gangliosides dans Dc différentiel de SLA au début semble limité

Evolution du profil d'anti-gangliosides dans le temps : peu de données, résultats contradictoires

[J Neurol Sci](#). 2003 Jun 15;210(1-2):99-103.

Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barré syndrome onset subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis.

Odaka M¹, Koqa M, Yuki N, Susuki K, Hirata K.

Table 1
Anti-ganglioside and anti-*C. jejuni* antibody titers of patients before and after onset of limb weakness

Days from onset to serum sampling	Anti- <i>C. jejuni</i>			IgM antibody against				IgG antibody against			
	IgM	IgG	IgA	GM1	GM1b	GalNAc-GD1a	GD1b	GM1	GM1b	GalNAc-GD1a	GD1b
-89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	16,000	8000	2000	16,000	16,000	-	32,000	32,000	16,000	16,000
5	-	16,000	2000	2000	8000	16,000	-	32,000	32,000	16,000	16,000
20	-	8000	500	1000	4000	8000	-	4000	4000	4000	2000
56	-	2000	-	1000	2000	4000	-	2000	4000	4000	2000
112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Negative.

Cutoff level of IgM, IgG, and IgA antibodies to *C. jejuni* are less than 500, 2000, and 500, respectively.

- Anti-gangliosides négatifs avant les premiers signes
- Titre plus élevés au début du syndrome
- Titre parallèles à ceux des anti-*Campylobacter pylori*
- Se négativent à la guérison

Temporal profile of anti-ganglioside antibodies and their relation to clinical parameters and treatment in Guillain–Barré syndrome

Rayomand Press^{a,*}, Sabrina Matá^b, Francesco Lolli^b, J. Zhu^a,
Thomas Andersson^c, Hans Link^a

Journal of the Neurological Sciences 190 (2001) 41–47

Table 1

Numbers of GBS patients with elevated titers of anti-ganglioside antibodies over the course of GBS, measured at five blood sampling occasions. Given are type and specificity of each anti-ganglioside antibody. Blood sampling occasions were I = 14 days, II = 40, III = 90, IV = 120 and V = 180 days after onset of GBS. Elevated titers are defined as antibody titers which exceeded the 99th percentile value of the same antibody in the combined control groups (OND, DN and HC)

Antibody specificity	Antibody class	Blood sampling occasion				
		I	II	III	IV	V
GM1	IgM	3/12	2/12	2/12	1/12	1/12
	IgG	2/12	5/12	2/12	2/12	0/12
	IgA	4/12	5/12	3/12	1/12	0/11
GD1a	IgM	1/12	2/12	4/12	4/12	2/12
	IgG	4/12	6/12	4/12	2/12	0/12
	IgA	0/12	1/12	1/12	1/12	0/12
GD1b	IgM	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	IgG	2/10	2/12	2/12	2/12	1/12
	IgA	2/12	2/12	0/10	0/12	0/12
GQ1b	IgM	0/12	1/12	2/12	0/12	1/12
	IgG	0/12	1/12	1/11	1/12	1/12
	IgA	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Sulfatide	IgM	2/12	2/12	2/12	1/12	1/12
	IgG	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	IgA	0/12	1/12	0/12	0/12	0/12
Cardiolipin	IgM	1/12	1/11	1/12	1/12	1/12
	IgG	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	IgA	2/12	2/12	2/12	0/12	0/12

- Certains patients ont une évolution « en cloche » :
 - taux le plus fort après la phase aiguë (40^{ème} jour IgG anti-GM1)et (90^{ème} jour et anti-GD1a).
- Certains patients ont un taux stable

Sur le plan technique

- **Préanalytique :**
 - moment du prélèvement par rapport aux premiers signes cliniques
 - La qualité et la conservation du prélèvement en préanalytique peuvent également avoir un impact sur la qualité du résultat.
- **Respect des conditions techniques**
 - durée et température d'incubation, qualité des tampons
 - les incubations longues à +4°C sont à privilégier
- **Qualité intrinsèque des kits :**
 - la qualité de la source et la pureté des antigènes
 - de la saturation des zones non coatées
 - Intérêt des différents gangliosides

Sur le plan technique

- **La maîtrise et la standardisation** des différents éléments techniques
 - Variabilité interlot : variations parfois nettes d'antigénicité des bandelettes d'un lot à l'autre
 - Test de lot +++
- **Seuil de positivité**
 - EEQ : essentiel des divergences de réponses à ce niveau
 - La plupart des kits d'immunodots n'ont pas de bande ou de spot seuil. Problème du seuil / zone grise en ELISA
- **Contrôles internes de qualités** multiparamétriques commerciaux inexistants et fabrication « maison » délicate.
- **EEQ** sur échantillons, scan?

Conclusions

- La recherche d'anti-gangliosides permet de définir des profils d'Ac associés aux diverses formes cliniques de neuropathies périphériques autoimmunes
- La connaissances des limites et modalités d'interprétation des tests essentielle à l'exploitation des résultats