

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année 2024

THESE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Description des techniques de dosage des anticorps anti-GAD dans
les syndromes neurologiques à anticorps anti-GAD : Etude
TecSNAGAD**

Présentée et soutenue publiquement le 03/10/2024 à 16h à la faculté de
médecine, au Pôle Recherche

par Chérine HAMIMED

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Pascal PIGNY

Assesseurs :

Madame la Professeure Hélène ZEPHIR

Monsieur le Professeur Bastien JOUBERT

Madame la Docteure Stéphanie ROGEAU

Directeur de thèse :

Madame la Docteure Tifanie ALBERTO

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Abréviations

CBA	<i>Cell based assay</i>
CCMR	<i>Centre de Compétence Maladies Rares</i>
CLIA	<i>ChemiLuminescence ImmunoAssay</i>
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CRMR	Centre de Référence des Maladies Rares
DT1	<i>Diabète de type 1</i>
EEG	<i>Electroencéphalogramme</i>
EL	<i>Encéphalite limbique</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
GABA	<i>Gamma amino-butyric acide</i>
GAD	<i>Glutamic acid decarboxylase</i>
GADA	<i>Anticorps anti-GAD</i>
GAD65-A	<i>Anticorps anti-GAD65</i>
GAD67-A	<i>Anticorps anti-GAD67</i>
IFI	<i>ImmunoFluorescence Indirecte</i>
IgG IV	<i>Immunoglobuline G Intra-Veineuse</i>

IRM	<i>Imagerie par résonance magnétique</i>
IRMA	<i>ImmunoRadioMetric Assay</i>
LCS	<i>Liquide cérébro-spinal</i>
NHANES	<i>National Health and Nutritional Examination Survey</i>
PEAI	<i>Polyendocrinopathie auto-immune</i>
PERM	<i>Encéphalomyélite progressive avec rigidité et myoclonies</i>
PLP	<i>Pyridoxine 5'-Phosphate</i>
RIA	<i>RadiImmuno Assay</i>
SNAGAD	<i>Syndrome neurologique des anticorps anti-GAD</i>
SPR	<i>Syndrome de la Personne Raide</i>

Sommaire

Table des matières

Avertissement.....	2
Remerciements	3
Abréviations.....	4
Sommaire	6
Introduction.....	8
1 Généralités	8
1.1 La Glutamate Acid Decarboxylase	8
1.2 Les anticorps anti-GAD et leur pathogénicité	10
2 Syndromes neurologiques associés aux anticorps anti-GAD	15
2.1 Généralités	15
2.2 Syndrome de la Personne Raide.....	18
2.3 Cérébellite à anticorps anti-GAD	20
2.4 Epilepsie auto-immune à anticorps anti-GAD	21
2.5 Encéphalite limbique à anticorps anti-GAD	22
3 Techniques biologiques de détection des anticorps anti-GAD	23
3.1 Radioimmunoassay	24
3.1.1 Description de la technique RIA.....	24
3.1.2 RIA et détection des anticorps anti-GAD	26
3.2 Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.....	27
3.2.1 Description de l'ELISA	27
3.2.2 ELISA et détection des anticorps anti-GAD	30
3.3 Immunodosage par Chimiluminescence.....	31
3.3.1 Description du CLIA.....	31
3.3.2 CLIA et détection des anticorps anti-GAD	33
3.4 Immunohistochimie et immunofluorescence.....	34
3.4.1 Description de l'immunohistochimie et de l'immunofluorescence	34
3.4.2 Immunohistochimie, IFI et détection des anticorps anti-GAD	35
3.5 Cell Based Assay	37
3.5.1 Description des Cell Based Assay	37
3.5.2 CBA et détection d'anticorps anti-GAD	38

3.6	ImmunoDOT	39
3.6.1	Description de l'immunoDOT	39
3.6.2	ImmunoDOT et détection des anticorps anti-GAD	40
4	Objectifs de la thèse	41
	Matériel et méthodes	44
1.	Design de l'étude.....	44
2.	Etude nationale	44
2.1	Population de l'étude nationale	44
2.2	Recueil des données pour la population nationale	49
3.	Etude Lilloise	50
3.1	Population SNAGAD	50
3.2	Population témoins.....	51
4.	Analyses statistiques	52
5.	Cadre réglementaire	54
5.1	Etude nationale	54
5.2	Etude lilloise	54
	Résultats.....	55
1	Flowchart	55
2	Description des populations SNAGAD nationale et Lilloise	56
3	Description des résultats des dosages d'anticorps anti-GAD au diagnostic dans la population nationale de SNAGAD	61
3.1	Résultats des techniques de dosage des anticorps anti-GAD (objectif primaire) 61	
3.2	Répartition des techniques de dosage des anticorps anti-GAD au cours du temps	68
3.3	Analyses de concordance et reproductibilité des techniques de dosage des anticorps anti-GAD réalisées au diagnostic : analyses de sous-groupe	73
3.4	Estimation des valeurs de performance des techniques de dosage des anticorps anti-GAD.....	79
4	Description du suivi clinico-biologique de la population SNAGAD Lilloise.....	81
	Discussion	85
	Conclusion.....	94
	Liste des tables.....	95
	Liste des Figures	96
	Références	98

Introduction

1 Généralités

1.1 La Glutamate Acid Decarboxylase

La Glutamate Acid Decarboxylase (GAD) est une enzyme exprimée largement au sein du système nerveux central mais également dans les cellules β pancréatiques. Elle catalyse la conversion du neurotransmetteur exciteur, le glutamate, en neurotransmetteur inhibiteur *gamma amino-butyric acide* (GABA).

L'enzyme GAD existe sous deux isoformes, GAD65 et GAD67, nommées selon leur poids moléculaire en kDa. Structuellement, elles sont composées d'un domaine amino-terminal (N-terminal), d'un domaine central qui possède un site de liaison au cofacteur pyridoxine 5'-phosphate (PLP), et d'un domaine carboxy-terminal (C-terminal) [1,2]. Lorsque nous réalisons une homologie de séquence entre les 2 enzymes, la portion N-terminale, qui représente les 95 premiers acides aminés, est la moins conservée avec seulement 35% de similitude. La portion C-terminale, elle, est la plus conservée avec 75% d'homologie de séquence [1]. L'activation de la protéine GAD est dépendante de sa liaison au cofacteur PLP. En effet, elle est activée sous sa forme holo-GAD qui est liée au PLP, et elle est inactivité dans sa forme apo-GAD [3].

La GAD67, codée par le gène GAD1 sur le chromosome 2, est exprimée tôt pendant l'embryogenèse et joue un rôle essentiel dans le développement adéquat des tissus neuronaux. Dans les neurones matures, la GAD67 activée est responsable de la production basale intraneuronale de GABA nécessaire au fonctionnement cellulaire [1,3,4].

La GAD65, codée par le gène GAD2 sur le chromosome 10, est principalement exprimée après la naissance, sous sa forme inactive, à la surface des vésicules présynaptiques qui sécrètent le GABA. En passant de la forme inactive à la forme active, la GAD65 permet une synthèse rapide du GABA dans la fente synaptique [1,3]. Lorsque les vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane plasmique, la GAD65 peut être transitoirement dans l'espace extracellulaire l'exposant à un risque d'immunogénicité plus important que la GAD67 intracellulaire [5] [Figure 1].

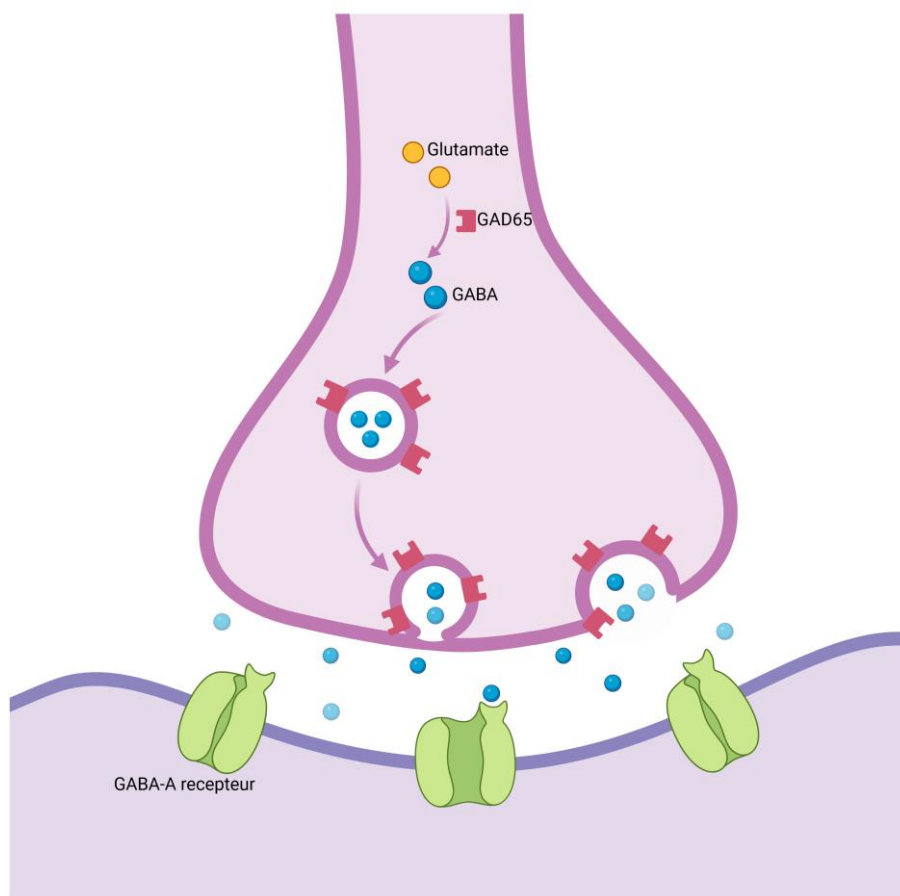


Figure 1: Illustration du rôle de la GAD65 au sein de la transmission synaptique, créée dans BioRender.com.

Lorsque cette protéine est rendue dysfonctionnelle, notamment par l'action d'anticorps anti-GAD (GADA), on observe une diminution de production de GABA au sein des synapses favorisant donc une hyperexcitabilité neuronale. Les principales pathologies auto-immunes associées à ces anticorps sont le diabète de type 1 (DT1) et les

syndromes neurologiques associés aux anticorps anti-GAD (SNAGAD). Ils comprennent le syndrome de la personne raide (SPR), la cérébellite, l'épilepsie auto-immune et l'encéphalite limbique (EL) [6–11].

1.2 Les anticorps anti-GAD et leur pathogénicité

Décrits pour la première fois en 1988, les GADA appartiennent principalement à la sous classe des immunoglobulines G [12,13].

Que ce soit dans le DT1 ou dans les SNAGAD, les anticorps ciblent majoritairement l'isoforme GAD65. Cependant, les domaines protéiques ciblés par ces anticorps (épitopes), diffèrent entre ces deux pathologies. Dans le DT1, les anticorps anti-GAD65 (GAD65-A) sont dirigés contre un épitope conformationnel du domaine central, et plus rarement du domaine C-terminal. Dans les SNAGAD, ces anticorps ciblent un épitope conformationnel du domaine central, ou un épitope linéaire du domaine N-terminal [14,15]. Au sein des patients SNAGAD, les spécificités d'épitopes ont été étudiées dans une cohorte de 21 patients atteints de SPR (plus ou moins associés à une ataxie cérébelleuse, une EL ou une épilepsie), et aucune différence significative d'épitope n'a été observée [16]. Dans une étude incluant 106 SNAGAD, d'autres auteurs décrivent que les GAD65-A de patients avec une EL cibleraient préférentiellement un épitope linéaire du domaine N-terminal alors que les GAD65-A des patients avec une épilepsie auto-immune auraient une tendance à avoir plus de réactivité avec le domaine C-terminal [17].

Les anticorps anti-GAD67 (GAD67-A) sont moins fréquents que les GAD65-A, spécifiques des patients avec une atteinte neurologique et ciblent un épitope linéaire [18]. Il sont parfois présents dans le DT1, mais souvent en association avec des GAD65-A [19]. Il n'est pas exclu que la positivité des GAD67-A soit le fruit d'une

réactivité croisée avec les GAD65-A puisque leurs séquences d'acides aminées sont similaires à 71% [5,19,20].

Les différences d'isoforme des GAD, de leur localisation au sein des neurones et, surtout, d'épitopes ciblés, expliquent pourquoi les techniques biologiques qui dénaturent les protéines ont des difficultés à détecter les GADA dans le DT1, où les épitopes conformationnels sont prédominants, contrairement aux SNAGAD où les épitopes peuvent être linéaires ou conformationnels [14]. Il est également possible que l'implication des GAD67-A soit sous-estimée car peu étudiée au sein des études et en routine biologique par les techniques de dosage disponibles.

Le GADA est un anticorps ciblant un antigène intracellulaire avec un mécanisme physiopathologique auto-réactif médié par des lymphocytes T cytotoxiques responsable d'une mort neuronale. Par ailleurs, l'accumulation intraneuronale de son précurseur, le glutamate, est également neurotoxique [4]. Ces hypothèses sont renforcées par la présence d'une atrophie cérébelleuse chez certains patients atteints d'une cérébellite ou d'une EL à GADA [6,22]. Par ailleurs, l'analyse de tissus temporomésiaux de patients atteints d'épilepsie pharmacorésistante, positifs aux GADA et ayant subi une lobectomie, révèle la présence de lymphocytes T cytotoxiques. Ces lymphocytes peuvent exercer un effet neurotoxique direct contre les interneurones GABAergiques, aggravant la perte d'inhibition GABAergique et exacerbant l'hyperexcitabilité neuronale, contribuant ainsi à la sévérité des crises épileptiques [23].

De plus, plusieurs études expérimentales suggèrent également une pathogénicité propre aux GADA. L'exposition de coupes de cervelet de rat au sérum ou au liquide cérébro-spinal (LCS) de patients atteints de cérébellite ou de SPR montrent en

immunohistochimie un marquage des GADA ciblant les terminaisons axonales des neurones GABAergiques [24]. La création d'un modèle de souris *knock out* pour GAD65 est responsable d'une hyperexcitabilité de l'amygdale et de l'hippocampe, générant une anxiété importante [25]. La présence de concentrations faibles de GABA dans le LCS des patients atteints de SPR soutient également l'hypothèse d'une réduction du GABA au niveau des synapses neuronales [26]. D'autres études ont aussi montré une diminution des taux de GABA cérébraux mesurés en spectroscopie-IRM, notamment dans le cortex sensori-moteur [27].

Le meilleur exemple pour décrire le rôle pathogène direct des GADA est celui du SPR, représenté dans la figure 2 [9]. Il se caractérise par la contraction simultanée des muscles agonistes et antagonistes. La physiopathologie du SPR repose sur le déséquilibre entre la voie catécholaminergique (excitatrice) contrôlant l'activité des unités motrices musculaires, et la voie inhibitrice GABAergique à son dépend. Cette hyperexcitabilité neuronale serait responsable d'une réponse corticospinale excessive, expliquant la raideur et les spasmes musculaires induits par les stimuli observés chez les patients SPR (hyperekplexie) [6,28]. En électromyographie, ce phénomène est détecté par une décharge continue des unités motrices des muscles agonistes et antagonistes, particulièrement difficile à mettre en évidence.

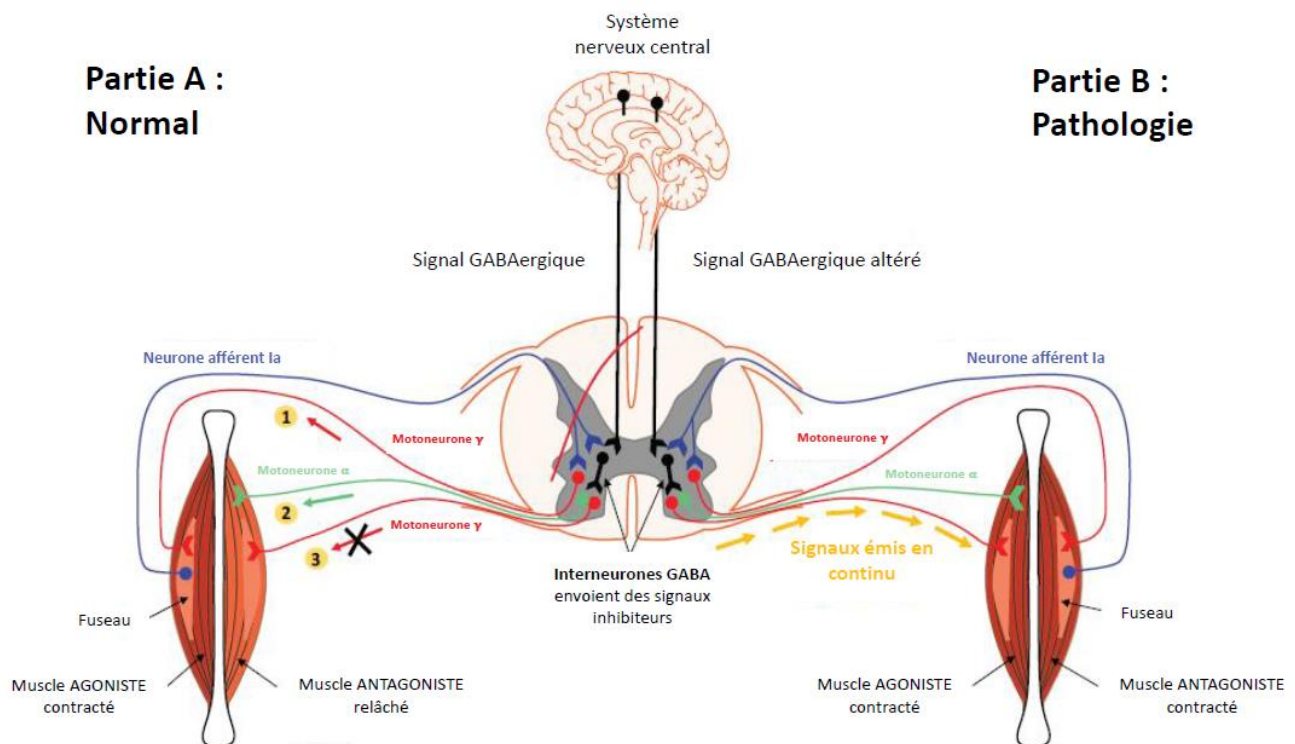


Figure 2 : Inhibition réciproque et génération de raideur chez les patients atteints du syndrome de la personne raide. Adapté de Tsiortou *et al.*, 2021 [9]

(a) Fonction normale : Les neurones gamma-moteurs du muscle agoniste envoient des signaux au fuseau pour se contracter [1]. En retour le neurone sensoriel afférent envoie des signaux dans la corne antérieure de la moelle épinière pour rendre compte de la contraction musculaire et activer l'interneurone inhibiteur GABAergique. Cette stimulation GABAergique induit un relâchement du muscle antagoniste (2) et surtout inhibe sa contraction (3).

(b) Pathologie : L'interneurone GABAergique ne peut plus inhiber la contraction du muscle antagoniste ni favoriser son relâchement. Ainsi les muscles agonistes et antagonistes sont alors continuellement stimulés.

Ce phénomène d'hyperexcitabilité neuronale induit par l'altération du système GABAergique permet aussi d'appréhender la physiopathologie de la cérébellite. Cette dysfonction GABAergique affecte les projections du cervelet vers le tronc cérébral, perturbant les fonctions oculomotrices, responsable cliniquement d'un nystagmus en altérant la réponse vestibulo-oculaire [24]. Dans le cadre de l'épilepsie auto-immune,

le neurotransmetteur glutamate a un effet pro-convulsivant alors que le GABA est anticonvulsivant. En présence de GADA, l'altération du système GABAergique inhibiteur favorise une neurotransmission excitatrice excessive, abaissant le seuil épileptogène avec des crises fréquentes et pharmacorésistantes [23,29].

In fine, la physiopathologie des GADA semble impliquer à la fois un blocage fonctionnel de la voie GABAergique, et une activation de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques, avec un risque de mort neuronale. Bien que les mécanismes physiopathologiques impliquant les GADA restent incertains, leur présence dans le sérum et/ou le LCS est un marqueur essentiel au diagnostic.

Une cohorte de suivi de la National Health and Nutritional Examination Survey (NHANES) de 1960 à 2014, retrouvait une prévalence de GADA dans le sérum, mesurée en RIA, de 2% chez des sujets sains âgés de 40 à 59 ans et de 3,1% après 60 ans [30]. Au sein de la cohorte de la *Mayo Clinic*, les GADA étaient également retrouvés dans le sérum de 8% de sujets sains mais à des titres faibles, inférieurs à 2,5 nmol/L [31]. Le titre sérique de ces anticorps est significativement plus important chez les patients SNAGAD que chez les patients DT1 [14,21,32]. Expérimentalement, l'injection de fortes doses de GADA au sein des 3 noyaux profonds du cervelet chez le rat, induit l'apparition de symptômes neurologiques dont la sévérité semble dose dépendante [33]. Au sein des SNAGAD, la concentration des GADA semble plus importante dans l'épilepsie auto-immune et la cérébellite que dans le SPR [17]. En 2000, dans une cohorte de 104 patients épileptiques toutes étiologies confondues, le dosage de GADA ne retrouvait aucune association significative entre des concentrations élevées et la pharmacorésistance. Quatre de ces patients souffrants d'épilepsie pharmacorésistante présentaient tout de même des titres de GADA au

moins trois fois supérieurs au titre le plus élevé mesuré dans la cohorte de patients avec épilepsie contrôlée [34]. Trois de ces 4 patients avaient un DT1 associé. Il a également été suggéré que des titres d'anticorps plus élevés seraient liés à une plus grande sévérité de la pathologie [12]. Toutefois, il n'existe actuellement aucune certitude quant à l'utilité diagnostique, pronostique ou de suivi des taux d'anticorps dans les SNAGAD.

2 Syndromes neurologiques associés aux anticorps anti-GAD

2.1 Généralités

Il est observé 4 phénotypes cliniques typiques : le SPR, la cérébellite, l'épilepsie auto-immune et l'EL. Chez un même patient, plusieurs manifestations cliniques peuvent coexister, formant ce qu'on appelle un syndrome de chevauchement [6,8,26]. Dans ce cadre, c'est le SPR, dit « SPR plus », qui est souvent associé à un ou plusieurs autres phénotypes [16,35].

Les SNAGAD sont définis par la présence d'un phénotype clinique typique, établi selon des critères spécifiques, associés à la détection de GADA dans le sérum et/ou le LCS [9,36].

Il s'agit d'une pathologie rare, avec une prévalence estimée entre 1 et 2 cas par million d'habitants, bien qu'elle soit probablement sous-diagnostiquée [37,38]. En 2000, le délai diagnostique variait entre 1 et 18 ans, avec une moyenne de 6,2 ans [37]. Bien que les délais diagnostiques actuels n'aient pas été réévalués, les SNAGAD

demeurent une entité diagnostique rare et complexe. La répartition des phénotypes cliniques étudiée dans une cohorte de la *Mayo-clinic* montre que le SPR est le plus fréquent (33%), suivi de la cérébellite (26%), de l'épilepsie auto-immune (17%) et enfin de l'EL (3%) [39]. Les syndromes de chevauchement représentent 20% des cas [39]. Ces pathologies touchent principalement les femmes, souvent jeunes même si l'âge de début moyen varie selon les phénotypes cliniques [6,26,37,40]. Par exemple, pour le SPR, il se situe entre 30 et 35 ans, avec une prédominance chez les Afro-Américaines [9]. Dans l'épilepsie auto-immune, l'âge de début est plus jeune avec une médiane de 26 ans au début des crises [23]. Il en est de même avec l'EL avec un âge médian de 23 ans [41], alors que pour la cérébellite il est plus tardif, entre 50 et 60 ans [24].

Les patients SNAGAD présentent fréquemment des comorbidités auto-immunes comme le DT1 [42]. Dans la cohorte de la *Mayo Clinic*, 59% des patients SNAGAD présentent une pathologie auto-immune, un chiffre qui concorde avec les résultats d'une autre étude menée sur la population japonaise [26,27]. Chez 35% des patients atteints de SPR, on retrouve une pathologie auto-immune telle qu'un DT1, une thyroïdite, anémie de Biermer, vitiligo... [6,8,23].

Contrairement à d'autres pathologies neurologiques associées aux anticorps anti-antigènes intracellulaires, les SNAGAD ne sont que rarement paranéoplasiques. Dans ces cas, les tumeurs les plus fréquentes sont le cancer du sein, du poumon, et chez les patients SPR, le thymome [8,43]. Lorsqu'une néoplasie est associée, les patients peuvent facilement avoir d'autres anticorps anti-neuronaux associés [43]. Par exemple, des anticorps anti-amphiphysine ont été retrouvés chez des patients avec un SPR et un cancer du sein [44]. Un cas de SPR paranéoplasique a révélé des anticorps anti-gephyrin [45].

La prise en charge thérapeutique des SNAGAD repose sur une approche multimodale visant à réduire l'activité auto-immune et à atténuer les symptômes neurologiques. Devant l'hétérogénéité et la rareté des tableaux cliniques, il n'existe à ce jour aucune étude comparative randomisée permettant de définir une prise en charge thérapeutique uniforme. Le traitement à visée immunologique associe des immunomodulateurs et parfois des immunosuppresseurs. On notera que les SPR sont le plus souvent uniquement traités par immunomodulateurs contrairement aux 3 autres entités syndromiques pour lesquelles il est recommandé une incrémentation rapide vers un traitement immunosuppresseur. Pour les patients atteints de SPR, il a été démontré que les immunoglobulines G polyvalentes (IgG IV) améliorent la raideur et la qualité de vie par rapport au placebo [46]. Les IgG IV sont bien tolérées, avec une dose classique de 2 g/kg sur 3 à 5 jours. Leur efficacité peut durer entre 4 et 12 semaines, bien que la fréquence des administrations ne soit pas clairement définie et varie selon les études [3,8,47,48]. Les bolus de méthylprednisolone (de 500mg à 1g/jours, durant 3 à 5 jours) peuvent également être proposés à la phase initiale d'un SNAGAD, mais doivent être utilisés avec prudence dans cette population de patients à risque d'avoir un diabète associé. [47,48]. Ces bolus de corticoïdes peuvent être suivis d'un relai per os à 1mg/kg en décroissance progressive jusqu'à leur arrêt [24]. Une étude sur les patients SNAGAD comparant les IgG IV à la méthylprednisolone montre que, dans le sous-groupe SPR, la méthylprednisolone permet une amélioration plus rapide de la raideur et des spasmes. [48]. En phase aigüe, les échanges plasmatiques sont une alternative en cas de tableau clinique sévère [7].

Chez les patients qui présentent un SNAGAD sévère ou en échec au traitement immunomodulateur seul, un switch peut être envisagé pour un traitement immunosuppresseur comme le rituximab, le cyclophosphamide, l'azathioprine, le

méthotrexate ou le mycophénolate mofétil [29,48,49]. La prise en charge non médicamenteuse, incluant la kinésithérapie et la rééducation, est essentielle.

2.2 Syndrome de la Personne Raide

En 1956, Moersch et Woltman ont décrit un trouble caractérisé par une rigidité musculaire et des spasmes, touchant principalement dans les muscles du tronc et en proximal des membres inférieurs, avec une excellente réponse au diazépam [11]. Ce trouble est nommé syndrome de la personne raide (SPR). Le rôle des GADA dans cette pathologie a été décrit en 1990 par Solemina *et al.* qui retrouvent ces anticorps chez 20 des 33 patients atteints de SPR [50].

Cliniquement, les patients présentent des spasmes musculaires et une raideur, au sein des muscles axiaux et proximaux des membres. Lorsque la raideur est sévère, la démarche des patients ressemble à celle d'une statue. Les spasmes sont souvent douloureux et peuvent être précipités par des stimuli inattendus : c'est l'hyperekplexie [6,37,39,40]. Dans certains cas, ces stimuli peuvent provoquer des spasmes sévères et continus accompagnés de raideur dans les muscles thoraciques avec des difficultés respiratoires, une tachycardie et une hyperhydrose, syndrome appelé "*status spasticus*", nécessitant une admission en urgence pour une perfusion de diazépam [6,9,51]. Les patients présentent souvent des troubles psychiatriques, notamment une anxiété importante dont la cause reste inconnue. Celle-ci peut être liée à l'anticipation des symptômes ou à un déséquilibre des neurotransmetteurs dans le cortex, perturbant l'équilibre entre excitation et inhibition. Cette théorie est supportée par la détection de titres élevés de GAD65-A chez 12 patients atteints de pathologies psychiatriques sévères comme la schizophrénie ou les troubles schizoaffectifs, en comparaison à 12 contrôles sains appariés en âge [52].

Les premiers critères cliniques diagnostiques de SPR ont été proposés en 1999, révisés en 2001, et reposent sur [9,39,40] :

- Une posture axiale anormale, avec une exagération de la lordose lombaire,
- Des spasmes répétés et déclenchés par des mouvements volontaires, des perturbations émotionnelles et des stimuli auditifs ou somatoesthésiques inattendus,
- Une absence de signes d'atteinte du tronc cérébral, pyramidaux, extrapyramidaux, vésicosphinctériens, sensitifs, ou plainte cognitive,
- Une activité continue, à l'électromyogramme, des unités motrices des muscles agonistes et antagonistes dans au moins un groupe musculaire axial [40].

En plus de ces critères, certains auteurs incluent la réponse clinique et électrophysiologique à la prise de diazépam en test thérapeutique [8]. Ces critères diagnostiques nous permettent de définir le SPR typique mais il existe des variantes. Parmi celles-ci, on retrouve le syndrome du membre raide [53] ou l'encéphalomyélite progressive avec rigidité et myoclonies (PERM syndrome) caractérisée par une rigidité musculaire sévère, des myoclonies, des crises d'épilepsie et des signes d'atteinte cérébrale et médullaire. A la différence du SPR typique, les variants sont moins souvent associés aux GADA, comme le PERM syndrome qui est associé aux anticorps anti-glycine récepteur [6].

La prise en charge spécifique symptomatique utilise des traitements médicamenteux tels que le diazépam et/ou le baclofène. Le diazépam est un agoniste des récepteurs GABA-A. Les schémas thérapeutiques varient de 15mg/j à 60mg/j répartis en plusieurs prises par jour [3]. Les doses nécessaires sont souvent très importantes tout en étant particulièrement bien tolérées [47]. On peut également proposer à ces patients des injections de toxines botuliques [54].

2.3 Cérébellite à anticorps anti-GAD

Les GADA ont été décrits associés à un syndrome cérébelleux, en 1995 [55]. La prévalence de la cérébellite à GADA au sein des ataxies est faible. Toutefois, la prévalence au sein du sous-groupe des ataxies cérébelleuses auto-immunes semble plus importante [24]. Dans une cohorte du Royaume-Uni et une autre du Japon incluant respectivement 320 et 58 patients, identifiés à l'inclusion comme ayant une ataxie cérébelleuse idiopathique, on retrouve des GADA respectivement pour 1,9% et 13,7% [56,57].

Cliniquement, la cérébellite à GADA est caractérisée par l'apparition d'un syndrome cérébelleux statique et cinétique associant des troubles de la coordination, de l'équilibre, une dysarthrie, un nystagmus et un tremblement d'intention [9,24,39,42,51]. L'apparition est subaigüe pour 1/3 des patients tandis que pour 2/3 elle est progressive sur 6 mois ou plus. Il est également décrit, dans près de 25% des cas, des atteintes aiguës et transitoires du tronc cérébral, associant vertiges, nausées, diplopie, précédant l'apparition du syndrome cérébelleux [24,38].

Au début des symptômes, l'IRM cérébrale est le plus souvent normale. Dans les cas avancés, elle peut montrer des signes d'atrophie cérébelleuse modérée, observés dans certaines séries chez ¼ des patients [24,39]. L'analyse du LCS peut révéler la présence de bandes oligoclonales [9,24].

2.4 Epilepsie auto-immune à anticorps anti-GAD

Les patients ayant une épilepsie auto-immune à GADA ont le plus souvent une épilepsie uni ou bi-temporale interne et réfractaire au traitement anti-épileptique [29,58,59]. C'est ainsi que l'épilepsie associée aux GADA a été caractérisée en 1998. C'est probablement l'une des causes les plus fréquentes d'épilepsie auto-immune [23].

L'électroencéphalogramme (EEG) ne retrouve pas d'anomalies spécifiques. Le tracé met en évidence des activités épileptiformes ou un ralentissement peu spécifique, inter ou per-critique, uni ou bitemporale. Un EEG normal n'exclut pas la maladie, surtout au début de son évolution [29]. L'IRM cérébrale pondérée en T2 FLAIR peut révéler des hypersignaux impliquant les régions mésio-temporales, reflets d'une inflammation locale ou simple conséquence d'une activité épileptique intense [8,29]. Certains patients présentent des déficits mineurs de mémoire secondaires à l'épilepsie, qui associées à des anomalies à l'IRM conduit à tort au diagnostic d'EL. Pour ces patients, le diagnostic d'épilepsie auto-immune avec hypertrophie de l'amygdale semble plus approprié [8]. L'analyse du LCS est souvent normal mais peut retrouver des signes d'inflammation avec une pléiocytose modérée associée à une synthèse intrathécale d'immunoglobulines [23].

Les traitements anti-épileptiques jouent un rôle majeur dans la prise en charge symptomatique. En pratique, peu de patients sont uniquement contrôlés par un traitement antiépileptique [29,60,61]. La plupart des patients continuent de présenter des crises séquellaires et même après une lobectomie temporale [8,60]. La stimulation du nerf vague peut être utile, avec une meilleure réponse que la chirurgie, compte tenu de la nature diffuse de la pathologie et la bilatéralisation fréquente du foyer épileptique [61].

2.5 Encéphalite limbique à anticorps anti-GAD

L'EL représente le dernier grand cadre phénotypique des SNAGAD. Les GADA ont été décrits en 2008 dans ce cadre syndromique [62]. Les symptômes incluent des troubles de la mémoire, des troubles psycho-comportementaux, des hallucinations, des crises épileptiques et une confusion [8,9,41,51]. Des critères diagnostiques ont été définis par Graus *et al.* en 2016 [49] :

1. Apparition subaiguë (en moins de 3 mois) de troubles mnésiques antérogrades, de crises d'épilepsie et/ou de symptômes psychiatriques suggérant une atteinte du système limbique,
2. Existence d'hypersignaux T2 FLAIR uni ou bilatéraux des lobes temporaux internes à l'IRM cérébrale,
3. Présence d'un des 2 éléments suivants :
 - Pléïocytose dans le LCS,
 - EEG montrant une activité épileptique ou des ondes lentes impliquant les lobes temporaux,
4. Exclusion raisonnable des diagnostics différentiels.

Le diagnostic d'EL à GADA se base sur ces critères diagnostiques associés à la détection des GADA dans le sérum et/ou le LCS.

En définitive, bien que les phénotypes cliniques puissent varier, le diagnostic repose sur l'association d'un phénotype clinique de SNAGAD avec la confirmation de la présence de GADA dans le sérum et/ou le LCS.

3 Techniques biologiques de détection des anticorps anti-GAD

Dans la littérature, les techniques utilisées pour la détection des GADA sont variées et ciblent préférentiellement l'isotype GAD65. Elles sont soit quantitatives : le *RadiImmunoAssay* (RIA), l'*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou le *ChemiLuminescence ImmunoAssay* (CLIA) ; soit qualitatives comme l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur coupes de cervelet de rat ou de singe, l'immunoDOT (DOT), et plus récemment le *Cell-Based Assay* (CBA).

Elles ont toutes été initialement développées et validées pour le dosage sérique de GADA dans le DT1. Chez les patients SNAGAD, les premières études établissant les concentrations de GADA retrouvent des titres de GADA jusqu'à 100 fois supérieurs à ceux observés chez les patients DT1 [14,63]. Les valeurs seuils définis pour les tests commerciaux quantitatifs ne sont pas adaptées à ces concentrations extrêmement élevées chez les patients SNAGAD, ce qui peut entraîner un effet plafond sur les titres mesurés. Les titres de GADA peuvent largement excéder cette estimation, selon la méthode de dosage. Par exemple, les concentrations mesurées en ELISA, avec dilutions itératives dans le sérum, peuvent atteindre jusqu'à 4 242 000 UI/ml [16], tandis qu'en RIA, les titres peuvent atteindre 41 700 UI/ml, également avec dilutions itératives [64].

Comme dans le cadre des syndromes neurologiques associés aux autres anticorps anti-neuronaux, plusieurs auteurs soulignent l'importance d'une analyse conjointe du sérum et du LCS pour mener au diagnostic de SNAGAD. Cela permettrait de compenser les difficultés d'interprétation de la positivité des GADA sériques chez les patients ayant un DT1 associé [65]. Cependant, nous rappelons que ces tests

biologiques ont été développés pour évaluer des concentrations sériques, leur interprétation dans le LCS doit donc être réalisée avec précaution.

3.1 Radioimmunoassay

3.1.1 Description de la technique RIA

Cette technique est utilisée en biochimie et immunologie, depuis les années 1960, pour quantifier des substances biologiques, sans les dénaturer, sous leur forme conformationnelle ou linéaire, en utilisant un isotope radioactif, tels que l'iode-125 ou le tritium H3. La détection de GADA peut se faire via les méthodes de RIA compétitive ou RIA double anticorps aussi appelé *ImmunoRadioMetric Assay* (IRMA).

Le RIA compétitif repose sur la concurrence entre un antigène radiomarqué et un antigène non radiomarqué pour la liaison à un anticorps [Figure 3].

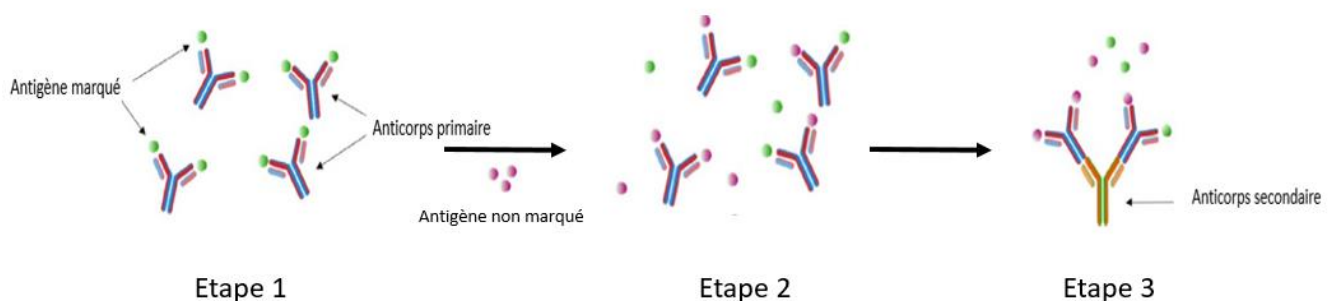


Figure 3 : Principes du dosage en RIA compétitif, à partir de Cerda-Kipper et al, 2019 [66]

- Etape 1 : L'antigène radiomarqué est mélangé à un anticorps de concentration connue, saturant ainsi les sites de liaison à l'anticorps.
- Etape 2 : Ajout de l'échantillon contenant l'antigène d'intérêt non marqué. Les deux antigènes, radiomarqué et non marqué, se disputent la liaison à l'anticorps. A mesure que la concentration d'antigènes non marqués augmente, les antigènes radiomarqués sont progressivement déplacés des sites de liaison à l'anticorps.
- Etape 3 : Ajout d'un anticorps secondaire (ou de particules insolubles) pour précipiter le complexe antigène-anticorps formé puis mesure de la radioactivité.

Dans le cadre de la recherche de GADA, il n'y a qu'un seul antigène radiomarqué et il correspond à la GAD65. Lorsque l'échantillon du patient est ajouté, les GADA, s'ils sont présents, entrent en compétition avec l'anticorps de concentration déterminée [Figure 3].

Après centrifugation ou filtration, la solution se sépare en deux phases : une phase liquide contenant les antigènes libres (marqués et non marqués), et une phase solide contenant les complexes précipités. La radioactivité est mesurée, généralement dans la phase solide. La quantité de radioactivité détectée est inversement proportionnelle à la concentration d'antigènes non marqués. En comparant cette mesure à une courbe standard, on estime la quantité d'antigènes cibles dans l'échantillon. Si la mesure est effectuée en phase liquide, la radioactivité est directement proportionnelle à la quantité d'antigènes marqués restant libres [66,67].

Concernant la technique IRMA, deux anticorps sont utilisés, l'un pour capturer l'antigène d'intérêt, l'autre radiomarqué pour révéler cet antigène. La radioactivité est directement proportionnelle à la concentration d'antigènes de l'échantillon étudié.

Peu importe la technique utilisée, le RIA détecte la forme conformationnelle de l'antigène, et n'est disponible sur le marché que pour les GAD65-A. Son principal avantage est sa sensibilité [66]. Elle fournit un résultat quantitatif. Cependant, en présence de concentrations élevées, ce qui est souvent le cas pour les SNAGAD, le signal peut paradoxalement diminuer à cause de la saturation des anticorps : c'est ce qu'on appelle une courbe en crochet [Figure 4]. L'absence de linéarité entre l'émission mesurée et la concentration à analyser mène à une sous-estimation de cette concentration, appelé effet crochet ou effet prozone [68,69].

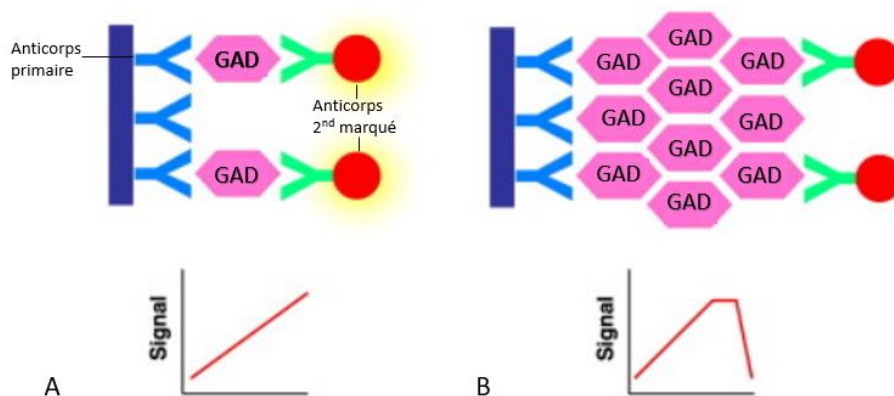


Figure 4: Schéma illustrant l'effet prozone avec un test immunologique de type « sandwich », à partir de Tritos et al., 2019 [70].

A : Conditions normales de dosage avec une liaison correcte de l'antigène GAD par les anticorps, conduisant à un signal proportionnel à la concentration d'antigène.

B : En présence d'un excès d'antigènes GAD, la formation du complexe sandwich est perturbée, empêchant l'anticorps secondaire de se lier correctement. Cela entraîne une diminution du signal, caractéristique de l'effet prozone.

Enfin, l'utilisation d'un radio-traceur requiert un équipement spécifique pour assurer un niveau de sécurité adéquat. Les réactifs sont coûteux et difficiles d'accès, nécessitant des autorisations pour leur acquisition. Leur utilisation est limitée par leur demi-vie et la gestion des déchets radioactifs.

3.1.2 RIA et détection des anticorps anti-GAD

Le RIA a été la première méthode utilisée pour la détection des GADA et est définie comme technique de référence pour le diagnostic du DT1 en 1995 [71,72].

Pour la détection de GADA, nous disposons de kits commercialisés par DiaSource Diagnostics® (Louvain-la-neuve, Belgique), RSR Limited® (Cardiff, Royaume-Uni), Medipan® (Berlin, Allemagne), CISBio International® (Codolet, France), IBL International® (Hamburg, Allemagne).

Le RIA est une des premières techniques ayant montré des concentrations de GADA plus importantes chez des patients SPR comparés à ceux atteints de DT1 [14,31]. En utilisant l'IRMA, 2/3 des patients SPR présentent une concentration de GADA $>$ à 200 nmol/L, et pour un tiers d'entre eux $>$ à 2 000 nmol/L, tandis que les concentrations ne dépassent pas 20 nmol/L chez les patients DT1. Dans cette étude, les auteurs n'utilisent pas un kit commercial et leurs résultats sont extrapolés en nmol/L en référence aux cpm émis par 22 fmol d'une courbe standard d'antigènes GAD65 marqués à l'iode-125 [31]. Dans une autre étude, les concentrations sériques de GADA mesurées en RIA (CISBio International®), sont associées à un SNAGAD lorsqu'elles sont $>$ à 2 000 UI/mL [36].

Les concentrations de GADA, même si elles sont exprimées dans la même unité, peuvent varier en raison des différents kits de mesure et des étalons utilisés. Cette diversité complique la comparaison directe et l'interprétation des résultats obtenus dans les différentes études, et ceux d'autant que les résultats restent exposés au risque d'effet crochet. Devant les inconvénients du RIA, d'autres techniques ont été développées.

3.2 Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

3.2.1 Description de l'ELISA

L'ELISA est une technique immuno-enzymatique utilisée pour détecter et quantifier une substance biologique dans un échantillon par une réaction enzymatique.

Différents types d'ELISA, tels que l'ELISA indirect ou l'ELISA bridge sont utilisés en routine pour la détection des GADA. Il existe aussi un kit ELISA sandwich proposé par MyBioSource®, mais étant donné qu'il est peu utilisé en routine clinique, nous avons décidé de ne pas en fournir les détails

3.2.1.1 ELISA indirect

Pour la détection des GADA, les kits d'ELISA indirect sont habituellement fournis par Euroimmun® (Lubeck, Allemagne), DLD Diagnostika® (Hamburg, Allemagne), IBL International® (Hamburg, Allemagne), Aeskulisa® (Wendelsheim, Allemagne), Biomerica® (Irvine, Etats-Unis), Medipan® (Berlin, Allemagne), Eurobio® (Les Ulis, France), et Kronus® (Star, Etats-Unis).

L'antigène d'intérêt, ici la GAD, est fixé sur une plaque de microtitration, puis incubé avec l'échantillon du patient (sérum ou LCS). Si le GADA est présent, il se lie à sa cible fixée sur la plaque. Une étape de lavage est réalisée puis, on ajoute un anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines (antiglobulines), lui-même conjugué à une enzyme. Un 2nd lavage permet d'éliminer les anticorps non liés. Le substrat de l'enzyme est ensuite ajouté, l'enzyme catalyse une réaction produisant un changement de couleur ou émettant une fluorescence, mesurable en spectrophotométrie [Figure 5]. L'intensité de ce signal est proportionnelle à la quantité de GADA présente. En plus de la colorimétrie et de la fluorescence, d'autres modes de détection sont possibles comme la chimiluminescence, l'électrochimiluminescence, ou la radioactivité.

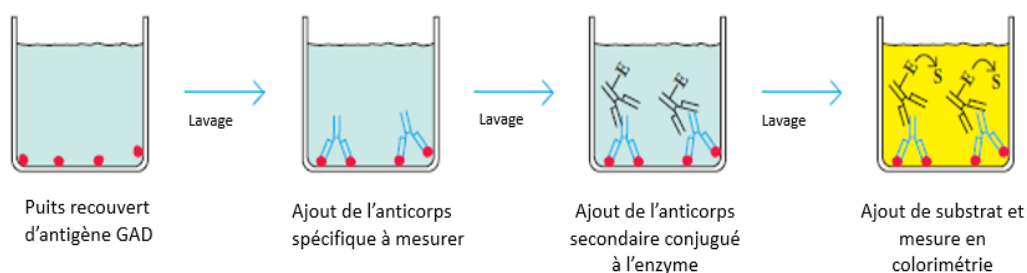


Figure 5: Schéma de l'ELISA indirect, à partir de Kuby Immunology, p 149 [67]

Cette technique offre une bonne sensibilité car chaque GADA expose plusieurs épitopes auxquels peuvent se lier plusieurs anticorps secondaires. Cela permet ainsi de détecter de faibles concentrations d'anticorps. Cependant, puisque la GAD est fixée

au fond du puit, de façon dénaturée, cette méthode présente le risque de perdre la reconnaissance de la forme conformationnelle de l'antigène. Elle peut également entraîner des faux positifs et une baisse de la spécificité par réactivité croisée de l'anticorps secondaire pour d'autres immunoglobulines présentes dans l'échantillon. Cette technique garde l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, bien connue des biologistes, rapide et peu coûteuse.

3.2.1.2 ELISA bridge

Pour la détection des GADA, il existe un kit ELISA Bridge de la marque RSR Limited®. Le principe diffère de celui de l'ELISA indirect [Figure 5] car chaque GADA présent dans l'échantillon se lie simultanément à deux épitopes antigéniques de deux protéines GAD, créant alors un pont (un épitope par fragment Fab de l'anticorps) [Figure 6]. Après l'incubation de l'échantillon du patient avec une plaque recouverte d'antigènes GAD, un 2nd antigène GAD conjugué à une enzyme est ajouté. Si des GADA sont présents, ceux-ci vont se lier simultanément à l'antigène fixé et l'antigène marqué. Cette méthode présente les mêmes inconvénients et avantages que l'ELISA indirect avec une légère augmentation de la spécificité, puisqu'en l'absence d'anticorps secondaire on diminue le risque de réaction croisée à d'autres immunoglobulines présentes dans l'échantillon.

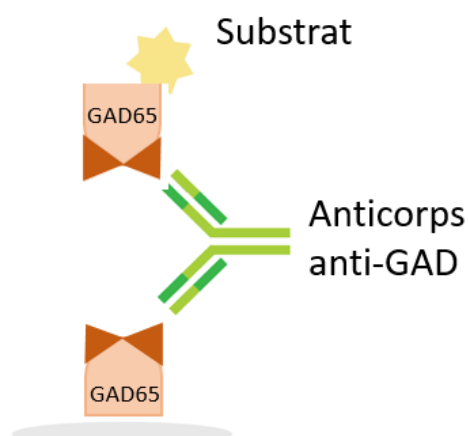


Figure 6 : Schéma de l'ELISA bridge

3.2.2 ELISA et détection des anticorps anti-GAD

Parmi les différentes techniques existantes pour le dosage des GADA, l'ELISA indirect est le plus couramment utilisé, même si l'ELISA bridge commence à avoir une place plus importante. Toutefois, ces kits n'ont été développés que pour le diagnostic du DT1. Une étude multicentrique de Wild *et al.*, en 1997, a évalué la performance et les avantages de l'ELISA pour la détection des GADA par rapport au RIA dans le DT1 [73]. Les résultats montrent que l'ELISA offre une sensibilité (Se : 66%) et une spécificité (Sp : 96%) comparables voire supérieures à celles du RIA (Se : 73%, Sp : 90%), tout en présentant des avantages significatifs en termes de coût, de sécurité, de rapidité d'exécution et de simplicité d'utilisation. Dans le DT1, l'ELISA constitue une alternative efficace et fiable pour la détection et la quantification des GADA [66,73,74].

Comme pour le RIA, les seuils de détection des kits commerciaux semblent inadaptés aux concentrations très élevées des GADA dans le SNAGAD : seuil maximal de détection de la marque Kronus® et Medipan® à 250 UI/mL, 500 UI/mL pour Aeskulisa®, 2 000 UI/mL pour RSR Limited®, Euroimmun® et Biomerica®.

Dans une étude utilisant le kit ELISA de Kronus®, avec un seuil de détection de maximal de GADA à 250 UI/mL, 16 patients suspects de SNAGAD atteignaient ce seuil. L'étude évaluait 12 sérums seuls, 3 couples LCS/sérum et 1 LCS seul. Les auteurs ont réalisé des dilutions itératives afin de déterminer les concentrations exactes de GADA, trouvant une concentration médiane très élevée de 182 090 UI/mL dans le sérum (min : 13 576 ; max : 685 000) et de 305,5 UI/mL dans le LCS (min : 196 ; max : 9788). Ils ont proposé un seuil de GADA supérieur à 10 000 UI/mL dans le sérum, et supérieur à 100 UI/mL dans le LCS avec une valeur prédictive positive de 88% à l'égard d'une auto-immunité neurologique [75]. Certains auteurs ont proposé d'inclure ces seuils sériques dans les critères diagnostiques de SPR. Un dosage

sérique de GADA en ELISA supérieur à 10 000 UI/mL pourrait être associé à un diagnostic de SPR, quel que soit le statut du diabète de type 1 du patient, alors que des concentrations inférieures à ce seuil nécessiteraient la preuve de GADA dans le LCS [7]. A ce jour, cela n'est que très peu utilisé car peu de centres réalisent ces dilutions itératives et chronophages. Comme pour le RIA, les concentrations obtenues sont soumises à l'effet crochet en l'absence de dilutions itératives.

Bien que ces tests aient été développés pour des dosages sériques, leur utilisation en routine dans le LCS semble possible [10,75]. Les kits décrits ne détectent que l'isoforme GAD65. Il existe le kit GAD67 ELISA de Thermofisher®, développé pour détecter spécifiquement la GAD67, mais très peu utilisé en routine.

3.3 Immunodosage par Chimiluminescence

3.3.1 Description du CLIA

Le CLIA permet de déterminer les concentrations d'un échantillon en mesurant l'intensité de la lumière émise par une réaction chimique. Pour la détection de GADA, on retrouve des kits disponibles en CLIA direct, indirect ainsi qu'en phase liquide.

Dans le CLIA direct, les luminophores sont couplés à l'antigène (GAD), ou à l'anticorps GADA [Figure 7]. Après incubation avec l'échantillon pour la fixation immunologique, un oxydant est ajouté pour activer le luminophore et former une molécule intermédiaire excitée. Cette molécule libère un photon en revenant à son état stable, émettant de la lumière. La luminescence est détectée et rapportée à une courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration de l'analyte dans l'échantillon [68,76]. Plus la concentration est élevée, plus le signal chimiluminescent est intense.

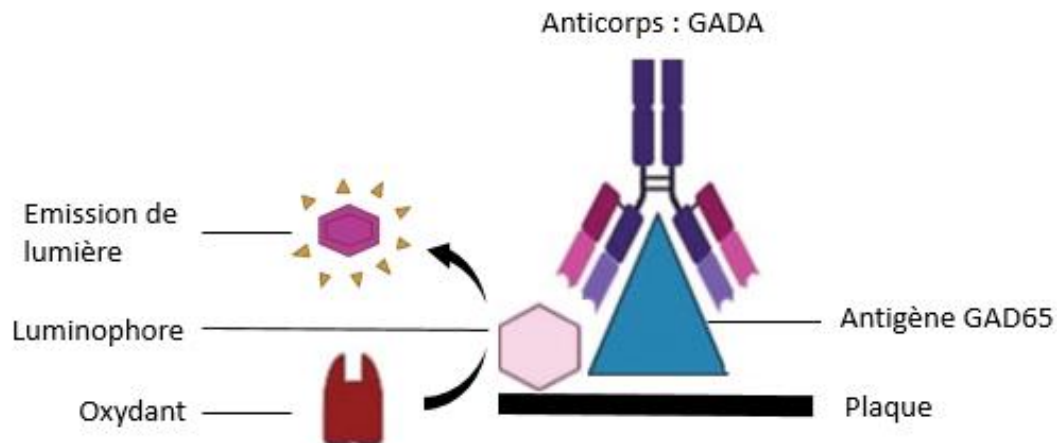


Figure 7: Schéma du principe de CLIA direct, à partir de Muddasir Khan *et al.*, 2023, [77]

Dans le CLIA indirect, une enzyme est utilisée pour amplifier le signal. Après la liaison antigène-anticorps, on ajoute un anticorps secondaire couplé au luminophore (1,2-dioxétane aryl phosphate AMPPD ou le luminol et ses dérivés) [68]. Une enzyme, telle que la phosphatase alcaline ou la peroxydase de raifort, est ajoutée. Elle catalyse la conversion de ces substrats en forme excitée. Les molécules telles que l'AMPPD et les dérivés de l'isoluminol sont plus stables que d'autres luminophores et entraînent une émission de lumière avec un rendement plus élevé [68].

Sur le plan technique, ces tests peuvent être réalisés sur un support solide ou liquide. Dans les CLIA en phase liquide, les luminophores sont directement couplés à un antigène en suspension, conjugué à des microbilles magnétiques qui flottent librement dans la solution. Cette méthode permet de détecter des épitopes conformationnels.

Le CLIA est donc une méthode quantitative avec une bonne spécificité car contrairement à l'IFI, elle ne dépend pas d'une source de lumière externe ce qui

diminue les interférences secondaires à la lumière de fond ou à l'auto-émission des échantillons [68]. Les réactifs sont plus stables, mais coûteux. L'automatisation du CLIA offre une reproductibilité élevée, réduisant les variations inter-laboratoires et améliorant la précision diagnostique. Le temps d'incubation court permet d'obtenir des résultats rapidement [76]. Le CLIA offre également une large gamme de mesures et une importante sensibilité.

Cependant, la détection du signal peut varier en présence de réactions chimiques complexes ou de concentrations élevées. Lors de réactions chimiques complexes, l'intensité du signal dépend du moment précis où l'échantillon est mesuré, ce qui peut affecter la précision des résultats. Pour des concentrations élevées, cette technique est également exposée au risque d'effet crochet [68,69].

3.3.2 CLIA et détection des anticorps anti-GAD

Le CLIA Maglumi® (Shenzhen, Chine), a été validé pour le diagnostic de DT1 dans une cohorte de 135 patients, avec des performances comparables à celles obtenues avec un dosage en ELISA Euroimmun® [78]. Cette technique a été développée pour la détection exclusive de GAD65-A dans le sérum de patients DT1. Pour autant, certains auteurs ont proposé son utilisation pour le doser les GADA dans le LCS pour le diagnostic des SNAGAD. Musso *et al.* (2023) ont testé 43 échantillons de LCS, dont 12 provenant de patients SNAGAD et 31 d'autres pathologies neurologiques. L'étude a comparé les performances du CLIA dans le LCS (Maglumi®) avec celles de l'ELISA (RSR Limited® ou Euroimmun®) dans le LCS. L'analyse a identifié une valeur seuil de 18 000 UI/L pour discriminer les SNAGAD avec une précision élevée (AUC de 0.921), ainsi qu'une corrélation de 100% avec l'ELISA [79].

L'intérêt du dosage quantitatif par CLIA, calibré sur des patients DT1, est limité par le risque d'effet crochet dans les SNAGAD, en l'absence de dilutions itératives. Un cas illustratif implique un patient suspect de cérébellite qui présente une concentration de GADA sérique mesurée une première fois en CLIA Maglumi® à 39,2 kIU/L et supérieur au seuil de 280 kIU/L dans le LCS [80]. Des dilutions itératives du sérum ont finalement révélé des concentrations sériques non linéaires, culminant à 276 500 kIU/L à une dilution de 1/1000, suggérant un effet crochet. En revanche, les dilutions du LCS ont montré une relation linéaire, atteignant 4050 kIU/L [80]. Comme décrit avec l'ELISA, les gammes d'étalonnage des kits ne seraient donc pas adaptées aux dosages sériques des GADA pour des patients SNAGAD, limitant l'intérêt d'une mesure quantitative. Toutefois, la présence de concentrations moins importantes et linéaires dans le LCS suggère que cette technique pourrait avoir une place dans le dosage quantitatif des GADA dans cette matrice.

3.4 Immunohistochimie et immunofluorescence

3.4.1 Description de l'immunohistochimie et de l'immunofluorescence

L'immunohistochimie utilise des anticorps marqués par des enzymes (comme la peroxydase ou la phosphatase alcaline) pour détecter des antigènes dans des tissus. Le complexe immun est détecté par une réaction enzymatique visible en microscopie optique. L'immunofluorescence est un sous-type d'immunohistochimie utilisant des fluorochromes [Figure 8]. Ces derniers émettent de la lumière après excitation à une certaine longueur d'onde, permettant la détection sous un microscope à fluorescence [81,82].

Il existe des techniques d'immunofluorescence directe et indirecte mais seule l'immunofluorescence indirecte (IFI) est utilisée dans la détection de GADA [Figure 8]. L'IFI utilise un anticorps secondaire, couplé au fluorochrome, ciblant l'anticorps primaire d'intérêt.

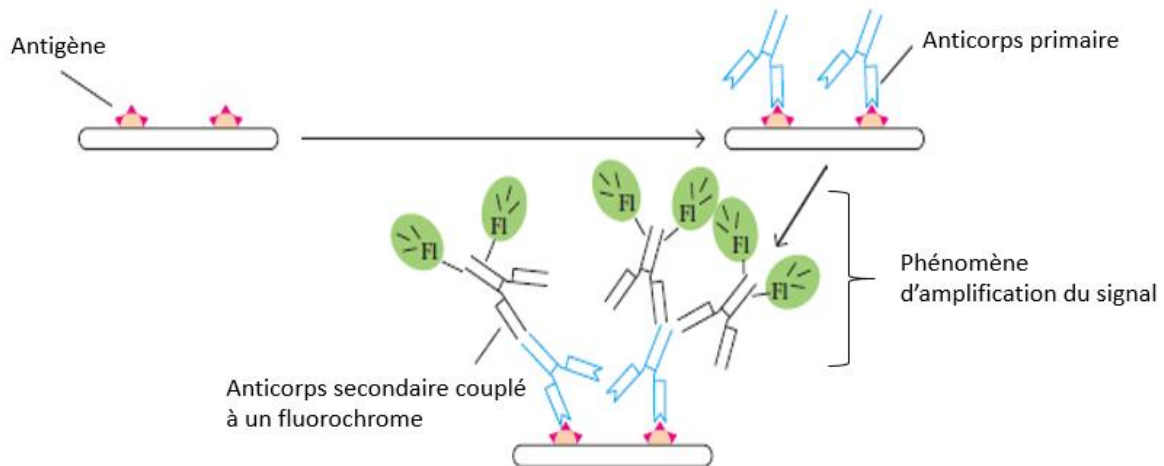


Figure 8: Schéma de l'IFI avec anticorps secondaires marqués par un fluorochrome, à partir de Joshi et Yu, 2013 [81]

C'est une technique plus sensible car plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer au même anticorps d'intérêt : on parle d'amplification du signal. Cette technique est donc qualitative mais avec la possibilité d'un résultat semi-quantitatif selon l'intensité du signal. Le principal inconvénient est le risque de réactivité croisée des anticorps secondaires.

3.4.2 Immunohistochimie, IFI et détection des anticorps anti-GAD

Solemina *et al.* ont confirmé en 1990 la présence de GADA chez des patients SPR en utilisant une technique d'immunohistochimie sur coupes de cervelet de rat, de cervelet humain et de pancréas [50].

La marquage GADA peut s'observer sur des coupes de pancréas au niveau des cellules β dans le cadre du DT1, ou sur des coupes de cervelet de singe ou de cervelet

de rat pour les SNAGAD [Figure 9]. On observe une fluorescence de la périphérie des neurones de la couche granulaire et des cellules de Purkinje, associée à des granulations isolées dans la couche moléculaire [3,83]. La détection de GADA est incluse au sein de la recherche d'anticorps anti-neuronaux. En effet, les kits commerciaux, Euroimmun® (Lubeck, Allemagne), ou Werfen® (Barcelone, Espagne), utilisent des coupes de cervelet car elles sont adaptées à de nombreuses cibles d'anticorps anti-neuronaux intracellulaires.

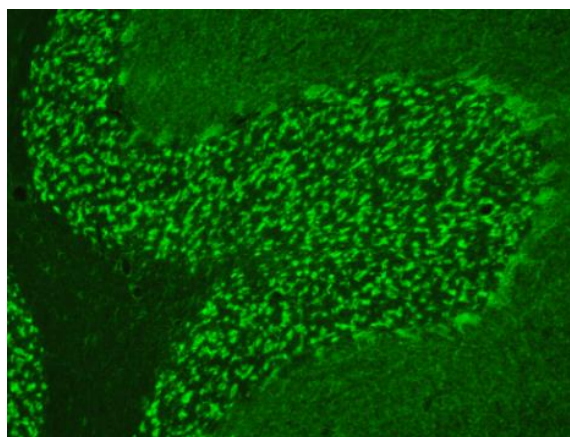


Figure 9 : Image d'IFI représentant un marquage péri-nucléaire de la couche granulaire typique de GADA-65 , à partir du colloque de 2018 du Groupe d'Etude de l'Auto Immunité [84]

L'IFI présente l'avantage de détecter à la fois l'isoforme GAD65-A et GAD67-A, sauf sur des coupes de pancréas où seul l'isoforme GAD65-A est présent. Toutefois, l'interprétation des résultats est opérateur-dépendante, et soumise à la qualité des coupes. De plus, la disponibilité des coupes de cervelet de singe limite l'accessibilité de cette technique. Les dilutions utilisées dans le sérum ou le LCS sont variables selon les kits commerciaux et il appartient au biologiste d'apprécier l'intérêt de réaliser des dilutions itératives. S'agissant d'une technique qualitative, celle-ci n'est pas à risque d'effet crochet. Des concentrations élevées peuvent conduire à des images floues ou saturées, mais cela ne provoque pas de sous-estimation des résultats car le signal

reste visuellement interprétable. Un aspect anti-GAD typique a été retrouvé pour des concentrations de GADA sérique supérieures à 1 800 UI/mL avec deux kits commerciaux de RIA (CIS Bio International® et Medipan®) [8]. Ainsi, les techniques qualitatives, comme l'IFI, restent positives pour des titres élevés de GADA, mais elles sont moins performantes dans la détection de faibles concentrations de GADA que les techniques quantitatives citées plus haut (RIA, ELISA, CLIA).

3.5 Cell Based Assay

3.5.1 Description des Cell Based Assay

Les CBA sont des tests quantitatifs pouvant utiliser des cellules vivantes ou fixées pour la détection d'anticorps. La lecture du signal peut se faire de différentes manières : fluorescence, absorbance, luminescence, colorimétrie ou radioactivité [85].

Cette technique utilise des cellules humaines ou murines transfectées avec de l'ADN humain pour l'expression de l'antigène cible à leur surface, ici la GAD [Figure 10]. Les GADA du sérum ou du LCS de patients testés se lient alors à ces antigènes, permettant une reconnaissance d'épitopes conformationnels, non dénaturés [65]. L'immunoréactivité est ainsi plus spécifique. Les cellules vivantes sont évaluées par cytométrie de flux, les cellules fixées peuvent l'être également comme elles peuvent être aussi analysées en IFI.

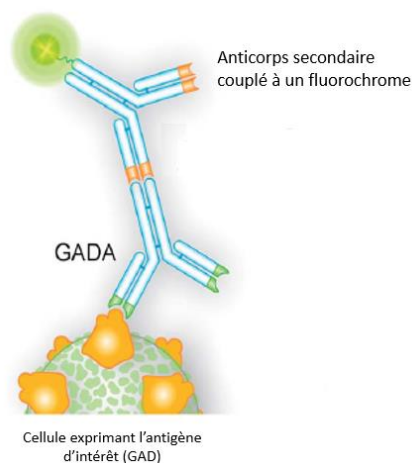


Figure 10 : Schéma de CBA pour la détection de GADA par IFI, adapté de Guerra et al., 2014 [86]

3.5.2 CBA et détection d'anticorps anti-GAD

Dans le cadre des SNAGAD, il est possible de détecter des GADA par l'IFI sur des cellules transfectées avec le gène *GAD65* et/ou *GAD67*. On utilise des cellules embryonnaires humaines de rein dite *Human Embryonar Kidney 293* (HEK293) transfectées avec le gène *GAD65* et/ou *GAD67*.

Une technique de CBA fixée, utilisant des cellules HEK293 exprimant *GAD65*, a été proposée pour détecter la présence de GADA chez des patients SNAGAD. Ces résultats sont positifs en CBA dans 64% des cas de patients SPR, 67% des patients avec un PERM syndrome, et ont été confirmés en IFI sur coupe de cervelet de singe et de rat. En comparaison, aucun des 50 sujets sains témoins ont été testés positifs en CBA ou en IFI [87]. Cette technique a l'avantage de ne reconnaître que les GADA associés aux SNAGAD sans interférer avec ceux du diabète. Ainsi, elle est utilisée pour confirmer la positivité des GADA en complément d'autres techniques [8,10,17].

Toutefois, l'utilisation de cellules fixées reste imparfaite, puisque la méthode de fixation est susceptible d'endommager certains épitopes. L'utilisation d'un CBA sur cellules vivantes, bien que plus sensible, est plus chronophage et techniquement exigeante,

ce qui limite son utilisation à des centres spécialisés [65]. Cela reste une technique de réalisation difficile et plus coûteuse que les autres. Pour autant, que ce soit sur cellules fixées ou vivantes, le CBA présente une des meilleure spécificité et sensibilité.

3.6 ImmunoDOT

3.6.1 Description de l'immunoDOT

Le DOT est une technique qui détecte des anticorps spécifiques en utilisant une membrane où sont fixés des antigènes d'intérêt. Il s'agit d'une bandelette sur laquelle les antigènes purifiés sont déposés en fines lignes parallèles sur une membrane [Figure 11]. La membrane est ensuite incubée avec l'échantillon biologique et si des anticorps spécifiques sont présents, ils se lient aux antigènes sur la bandelette. Les anticorps sont ensuite détectés à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un substrat chromogène, comme la phosphatase alcaline [88]. Une solution chromogène/substrat est utilisée pour produire une réaction colorée visible, et si l'échantillon contient des anticorps, une bande sombre apparaît à l'endroit de l'antigène correspondant.

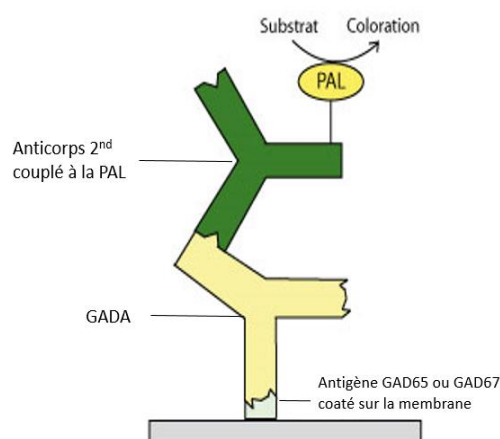


Figure 11 : Illustration d'un immunoDOT, adapté à partir du site internet Euroimmun® [88]

PAL : phosphatase alcaline

Le DOT reconnaît des épitopes uniquement dans leur conformation linéaire. Il est donc peu adapté à la détection des GADA dans le cadre du DT1. C'est un test automatisé, rapide, et simple à mettre en œuvre.

3.6.2 ImmunoDOT et détection des anticorps anti-GAD

Dans le cadre de la détection des GADA, on retrouve les kits commerciaux proposés par Euroimmun®, Medipan®, DLD Diagnostika®, Ravo diagnostika® (Freiburg, Allemagne) et GA Generic assay GmbH® (Dahlewitz, Allemagne).

Le développement de DOTs spécifiques à la détection des anticorps anti-neuronaux intègre la détection de GAD65-A, et pour certains kits également la détection de GAD67-A. Bien qu'il s'agisse d'une technique qualitative, une quantification de l'intensité de cette bande sombre est souvent proposée entre une et trois croix [89]. Certains auteurs semblent montrer que la détection de GAD65-A avec un test commercial (Euroimmun®) n'est possible qu'à partir d'un titre d'anticorps $\geq 1\,400$ UI/mL, (2 kits de RIA CIS Bio International® et Medipan®). Dans une étude analysant 331 échantillons, 4 sont revenus positifs en DOT mais négatifs en RIA. Il s'agissait de patients SNAGAD ayant possiblement des concentrations élevées de GADA responsables de faux négatifs en RIA par effet crochet [8].

Ainsi le DOT semble être une technique intéressante à réaliser en complément d'une technique qualitative. Au sein des études, les DOT sont le plus souvent utilisés en association avec d'autres méthodes comme l'IFI, l'ELISA ou la CLIA [8,17,17,23]. Il est particulièrement utile pour un dépistage rapide et initial, ce d'autant que d'autres anticorps anti-neuronaux sont également recherchés dans le même temps. Le risque de faux positifs n'est pas négligeable, diminuant sa spécificité.

4 Objectifs de la thèse

A ce jour, les tableaux cliniques devant faire suspecter un SNAGAD sont bien décrits, cependant la preuve de la présence de GADA chez ces patients reste complexe.

En endocrinologie, pour le DT1, cette problématique a été étudiée lors de « *International GADAb Workshop* » de 1995 et a permis de définir le RIA comme méthode de référence [71]. Devant une incidence faible des SNAGAD, nous ne disposons pas de données de la littérature suffisamment robustes permettant de définir des recommandations ni sur une analyse biologique de référence, ni sur la ou les matrices nécessaires entre le sérum et/ou le LCS. Nous n'avons pas non plus connaissance de l'intérêt d'un dosage quantitatif que ce soit pour le diagnostic ou le pronostic.

L'objectif principal de cette thèse est de décrire les résultats des différentes techniques biologiques ayant permis la détection des GADA dans une population nationale de patients avec un diagnostic de SNAGAD retenu.

Les objectifs secondaires consistent à :

- Décrire la population nationale et Lilloise de SNAGAD,
- Décrire l'évolution des techniques biologiques de dosage des GADA au cours du temps,
- Estimer la concordance et la reproductibilité des techniques biologiques de dosage des GADA entre elles,
- Estimer les valeurs de performance du RIA, ELISA, IFI et DOT dans le sérum et le LCS pour la détection des GADA au diagnostic d'un SNAGAD,

- Décrire l'évolution clinico-biologique de patients SNAGAD suivis au CHU de Lille.

In fine, nous souhaiterions, par ce travail multicentrique, aider à la réflexion autour de recommandations sur la ou les techniques de dosage permettant le diagnostic d'un SNAGAD la plus fiable, reproductible, accessible dans le plus de centres et un bon rapport bénéfice/coût.

Le critère de jugement principal est la technique et le résultat du dosage des GADA dans le LCS et/ou le sérum au diagnostic d'une population nationale de patients SNAGAD.

Le diagnostic de SNAGAD est défini par l'association d'une clinique typique et la détection de GADA dans le LCS et/ou le sérum quelle que soit la technique.

Les critères de jugement secondaire sont :

- Pour la population nationale de SNAGAD :
 - La description de la population nationale de SNAGAD, avec notamment la description des différents tableaux cliniques, leur association à une néoplasie,
 - La description de l'évolution des techniques biologiques de dosage des GADA au cours du temps,
 - La description de la concordance et la reproductibilité des techniques biologiques de dosage des GADA entre elles,
 - L'estimation des valeurs de performance de le RIA, l'ELISA, l'IFI et du DOT dans le sérum et le LCS pour la détection des GADA dans le SNAGAD, avec comme population témoin des patients ayant une autre maladie neurologique inflammatoire ou non inflammatoire.

- Pour la population Lilloise de patients SNAGAD suivis :
 - La description de la population lilloise de SNAGAD, avec notamment la description des différents tableaux cliniques, leur association à une néoplasie ou à une pathologie auto-immune,
 - La description de l'évolution clinique des patients,
 - La description de l'évolution biologique des GADA au cours du suivi,
 - La description de la prise en charge thérapeutique des patients.

Matériel et méthodes

1. Design de l'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective observationnelle des données cliniques et biologiques issus de 2 cohortes, l'une nationale et l'autre locale lilloise.

2. Etude nationale

2.1 Population de l'étude nationale

Les patients inclus devaient être majeurs à la date du 1^{er} janvier 2024 et pris en charge au diagnostic dans un centre hospitalier français. Ils devaient par ailleurs :

1. Présenter une clinique compatible avec un SNAGAD soit un SPR, une cérébellite, une épilepsie auto-immune, une EL, un PERM syndrome,
2. Avoir un dosage de GADA au moment du diagnostic, positif dans le LCS et/ou dans le sérum, quelle que soit la technique utilisée.

Le moment du diagnostic a été défini comme étant la période au cours de laquelle des symptômes cliniques compatibles avec un SNAGAD étaient associés à un premier dosage biologique de GADA.

En cas de prélèvements biologiques multiples, nous les retenons dans la phase de diagnostic s'ils respectaient un délai de maximum 3 mois avec le premier dosage.

Les participants ont été identifiés à partir de 3 bases de données :

1. La base de données nationale du Centre de Référence des Maladies Rares (CRMR) de Lyon, gelée en novembre 2023.
2. La base de données du centre de compétence maladies rares (CCMR) du CHU de Lille, gelée en juin 2024.
3. La base de données du centre constitutif maladies rares du CHU de Toulouse, gelée en février 2024.

La base de données du CRMR du Lyon a identifié 65 centres depuis lesquels les patients étaient issus :

- Auvergne-Rhône-Alpes :
 - CH de Annecy
 - CH d'Aurillac
 - CH de Bourg En Bresse
 - CHU de Clermont Ferrand
 - CHU de Grenoble
 - Hospices civils de Lyon
 - CH de Thonon Les Bains
 - CH de Vienne
 - CH de Saint Luc Saint Joseph
- Bourgogne-Franche-Comté :
 - CH de Besançon
 - CH de Chalon sur Saône
 - CHU de Dijon
 - CH de Lons Le Saunier

- Bretagne :
 - CH de Lorient
 - CH de Quimper
 - CHU de Rennes
 - CH de Saint Brieuc
 - CH de Saint-Malo
- Centre-Val de Loire :
 - CH d'Orléans
 - CHU de Tours
- Corse :
 - CH d'Ajaccio
- DOM-TOM :
 - CHU de la Guadeloupe
 - CHU de la Guyane
 - CHU de la Martinique
 - CHU de la Réunion
- Grand Est :
 - CH d'Epinal
 - CH de Metz-Thionville
 - CH de Mulhouse
 - CHU de Nancy
 - CHU de Reims
 - CHU de Strasbourg
 - CH de Verdun
- Hauts-de-France :
 - CHU d'Amiens

- CH d'Arras
- CH de Compiègne
- CHU de Lille
- Île-de-France :
 - Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP) avec un centre constitutif maladies rares à La Pitié Salpêtrière, regroupant 23 hôpitaux (Avicenne, Bicêtre, Bichat, Boulogne Billancourt, Cergy Pontoise, Chartres, Cochin, Corbeil Essonne, Foch, Henri Mondor, Lariboisière, Mantes La Jolie, Melun, Orsay, Paul Brousse Villejuif, La Pitié Salpêtrière, Robert Debré, Rothschild, Saint Antoine, Saint Denis, Saint Joseph, Sainte Anne, Trousseau)
- Normandie :
 - CH de Caen
 - CH de Cherbourg
 - CH de Le Havre
 - CHU de Rouen
 - CH de Saint Lô
- Nouvelle-Aquitaine :
 - CH de Bayonne
 - CHU de Bordeaux
 - CH de Brive
 - CH de Libourne
 - CHU de Limoges
 - CH de Niort
 - CH de Pau
 - CH de Périgueux

- CHU de Poitiers
- Pays de la Loire :
 - CHU d'Angers
 - CH de La Roche sur Yon
 - CH de Le Mans
 - CHU de Nantes
- Occitanie :
 - CHU de Montpellier
 - CHU de Nîmes
 - CH de Perpignan
 - CHU de Toulouse
- Provence-Alpes-Côte d'Azur :
 - CH de Avignon
 - CHU de Marseille - Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille
 - CH de Saint Joseph – Marseille
 - CHU de Nice
 - CH de Sainte Anne (Toulon)
 - CH de Valence

L'ensemble de ces centres ont été contactés par téléphone puis par mail pour les informer de l'étude et des données recueillies. Huit centres n'effectuaient aucun dosage de GADA au sein de leur laboratoire et 57 ont accepté de nous communiquer leurs résultats.

Les patients étaient exclus en cas de tableau clinique non compatible avec un SNAGAD (neuropathie périphérique, syndrome extrapyramidal ...) ou de données manquantes cliniques ou biologiques, notamment la date du prélèvement.

2.2 Recueil des données pour la population nationale

Le recueil a été effectué en deux temps :

(i) Les données clinico-biologiques recueillies auprès du CRM de Lyon incluaient :

- Les données épidémiologiques : sexe, date de naissance,
- La présentation clinique du SNAGAD : SPR, cérébellite, épilepsie auto-immune, EL, PERM syndrome,
- La présence de néoplasie associée,
- Le centre depuis lequel était issu le patient,
- Les techniques et les résultats du dosage des GADA au diagnostic, effectués au CRM de Lyon et au sein de l'unité fonctionnelle d'auto-immunité du centre d'analyses biomédicales du CHU de Lyon Sud :

- Matrice : sérum, LCS,
- Technique : CBA, ELISA, DOT, IFI, RIA,
- Date du dosage,
- Résultats : positif, négatif ainsi que le titre lors de dosages quantitatifs.

En présence d'un résultat dit « positif douteux », nous avons décidé de considérer ce résultat comme positif, malgré la faiblesse du signal, en tenant compte du contexte clinique et des résultats positifs parfois obtenus par d'autres techniques de dosage des GADA.

(ii) Les données biologiques recueillies auprès des centres dont étaient issus les patients, incluaient les résultats du dosage des GADA au diagnostic :

- La matrice : sérum, LCS,
- La technique : CLIA, ELISA, DOT, IFI, RIA,
- La date du dosage,
- Le résultat : positif, négatif ainsi que le titre lors de dosages quantitatifs.

3. Etude Lilloise

3.1 Population SNAGAD

Les patients inclus devaient être majeurs à la date du 30 juin 2024, pris en charge au CHU de Lille pour un SNAGAD avec un tableau clinique compatible associé à la positivité des GADA dans le LCS et/ou le sérum.

Entre octobre 2006 et juin 2024, 23 patients répondant à ces critères ont pu être retrouvés au sein de la base de données du CHU de Lille.

Les données recueillies pour ces patients incluaient :

- Les données biographiques : sexe, date de naissance,
- La présentation clinique de SNAGAD : SPR, cérébellite, épilepsie auto-immune, EL,
- La date du diagnostic de SNAGAD,
- L'association à d'autres pathologies auto-immunes ou une néoplasie,
- Les résultats du dosage des GADA au diagnostic et au cours du suivi :
 - Matrice : LCS, sérum,
 - Technique : CBA, ELISA, DOT, IFI, RIA,
 - Date du dosage,
 - Le résultat : positif, négatif ainsi que le titre lors de dosages quantitatifs.
- La prise en charge thérapeutique,
- L'évolution clinique, décrite selon un score arbitraire allant de 1 à 5 :

- « 1 » : guérison complète,
- « 2 » : amélioration partielle,
- « 3 » : stabilisation de l'état clinique,
- « 4 » : dégradation clinique,
- « 5 » : décès lors du suivi.

Les données ont été recueillies par l'intermédiaire du logiciel SILLAGE (dossier médical informatisé des patients du CHU de Lille) et du logiciel MOLIS (données biologiques).

3.2 Population témoins

Afin d'estimer les valeurs de performance des différentes techniques de dosage des GADA, nous disposons de 49 couples sérum/LCS de patients témoins Lillois présentant soit une autre maladie neurologique inflammatoire, soit une maladie neurologique non inflammatoire (NI).

Les données recueillies pour ces patients incluaient :

- Les données épidémiologiques : sexe, date de naissance,
- Le diagnostic de leur pathologie,
- Les résultats du dosage des GADA réalisés à titre exploratoire pour l'étude :
 - Matrice : LCS, sérum,
 - Technique : ELISA, RIA, IFI, DOT,
 - Le résultat : positif, négatif ainsi que le titre lors de dosages quantitatifs.

Dans cette population témoin, le dosage en ELISA a été effectué avec le kit de RSR Limited® (Cardiff, Royaume-Uni), en RIA avec le kit de DIA Source® (Louvain la neuve, Belgique), en IFI avec le kit de Inova diagnostics® (San Diego, Etats-Unis) à

partir de coupes de cervelet de singe et le DOT a été réalisé à partir d'un kit Euroimmun® (Berlin, Allemagne).

4. Analyses statistiques

Le flow chart a été réalisé par l'intermédiaire du site internet www.drawnio.fr. Les graphiques en histogramme ont été réalisés par le logiciel EXCEL®. Les diagrammes de Venn ont été réalisés avec le logiciel R®.

Concernant les techniques de dosages quantitatives, nous disposons d'un titre dans le cadre de dosage en ELISA ou en RIA. Les kits utilisés à l'échelle nationale sont multiples et présentent des performances variables entre les marques, mais également au sein d'une même marque selon les séries de kits utilisées. Dans les SNAGAD les titres sont souvent élevés, soit avec titre précis si dans la borne de détection du kit utilisé, soit supérieur au seuil maximal de détection du kit. Dans le cas où le seuil maximal est atteint, il est possible de réaliser des dilutions successives pour établir le taux précis de GADA dans l'échantillon. Néanmoins, cela reste à l'appréciation du biologiste et peu réalisé en routine clinique. Pour les titres dans les bornes de détection du kit, les résultats ont été donnés en moyenne pour les valeurs quantitatives suivant la loi normale ou en médiane pour les valeurs quantitatives ne suivant pas la loi normale. La moyenne ou médiane des résultats quantitatifs n'a été calculée qu'à partir de 3 valeurs obtenus pour un même kit.

Nous avons analysé l'évolution des techniques biologiques au cours du temps, soit d'octobre 1998 à novembre 2023, date de fin de recueil de la base de données nationale. Nous avons segmenté arbitrairement notre base de données en 5 périodes allant de 1998 à 2003, 2004 à 2008, 2009 à 2013, 2014 à 2018 puis 2019 à 2023.

Nous avons effectué des analyses de sous-groupes pour les patients ayant eu plusieurs prélèvements biologiques au moment du diagnostic. En effet, un même patient peut avoir bénéficié de plusieurs techniques de dosage dans une même matrice, mais aussi de plusieurs fois la même technique dans une même matrice ou de plusieurs fois la même technique dans une matrice différente. Ces résultats ne sont détaillés que pour des sous-groupes d'au moins 10 patients. Concernant les analyses en sous-groupe, trois cas ont été distingués :

- (i) Sous-groupe 1 : Patients ayant bénéficié de plusieurs techniques différentes sur une même matrice. Dans ce sous-groupe, nous analysons la **concordance inter-test** au sein d'une même matrice (ex : ELISA sérum vs CBA sérum), définie comme la capacité de différentes techniques à obtenir le même résultat (positif ou négatif) lorsqu'elles sont appliquées à une même matrice (sérum ou LCS).
- (ii) Sous-groupe 2 : Patients ayant eu un dosage de GADA avec la même technique sur 2 matrices différentes (LCS vs sérum). Dans ce deuxième sous-groupe, nous analysons la **concordance inter-matrice** pour une même technique, par exemple ELISA sérum vs ELISA LCS.

Pour ces analyses de sous-groupes 1 et 2, nous avons exclu les patients « doublons discordants ». Si un patient a bénéficié de plusieurs fois la même technique au sein de la même matrice, c'est-à-dire un « doublon », nous n'avons pris en compte que les patients pour lesquels les résultats des doublons étaient concordants. Par exemple, dans le cas où nous analysons les résultats ELISA sérum vs CBA sérum, si un patient avait bénéficié de deux ELISA sérum discordants (l'un positif et l'autre négatif), ce dernier était exclu de l'analyse. Ainsi, notre approche s'est basée sur un récapitulatif

par patient et par technique, indépendamment de la marque du kit utilisé et du nombre total de dosages effectués avec une même technique.

(iii) Sous-groupe 3 : Patients ayant bénéficié de plusieurs dosages au diagnostic avec la même technique sur une même matrice, c'est-à-dire les « doublons » (ex : ELISA sérum 1 vs ELISA sérum 2). Dans ce troisième sous-groupe, nous analysons la **reproductibilité** d'une même technique au sein d'une même matrice.

Pour ces trois analyses de sous-groupes, les résultats sont présentés comme suit :

- Discordants : un résultat est positif et l'autre négatif.
- Concordants positifs : les deux résultats sont positifs.
- Concordants négatifs : les deux résultats sont négatifs.

Afin d'estimer les valeurs de performance de chaque technique, comme pour les analyses de sous-groupe, nous avons exclu les patients « doublons discordants », car il était impossible de savoir si ce patient avait, finalement, un résultat positif ou négatif pour le test.

5. Cadre réglementaire

5.1 Etude nationale

Cette étude a été déclarée à la CNIL sous la référence DEC24-035. La DRCI de Lille a ensuite contacté l'intégralité des centres préalablement identifiés pour l'établissement d'un contrat de partage de données de santé.

5.2 Etude lilloise

Cette étude a été déclarée à la CNIL, sous la référence DEC24-034.

Résultats

1 Flowchart

A partir des trois bases de données du CRMR, du CHU de Toulouse et du CHU de Lille, 362 patients étaient incluables et répartis ainsi :

- Liste CRMR : 313 patients
- Liste CHU de Toulouse : 26 patients
- Liste CHU de Lille : 23 patients

Après discussion avec le Dr Tifanie Alberto et le Pr Hélène Zéphir, 25 patients ont été exclus car ils ne répondaient pas aux critères cliniques de SNAGAD. Douze autres patients ont été exclus pour des données cliniques (n=9) et des résultats d'analyses biologiques (n=3) manquants. Enfin, 21 patients supplémentaires ont été exclus car les conditions de dosage au diagnostic ne pouvaient être vérifiées.

Après exclusion des doublons (n = 11), 293 patients ont été inclus dans la cohorte nationale [Figure 12]. Nous n'avons recueilli aucune opposition documentée.

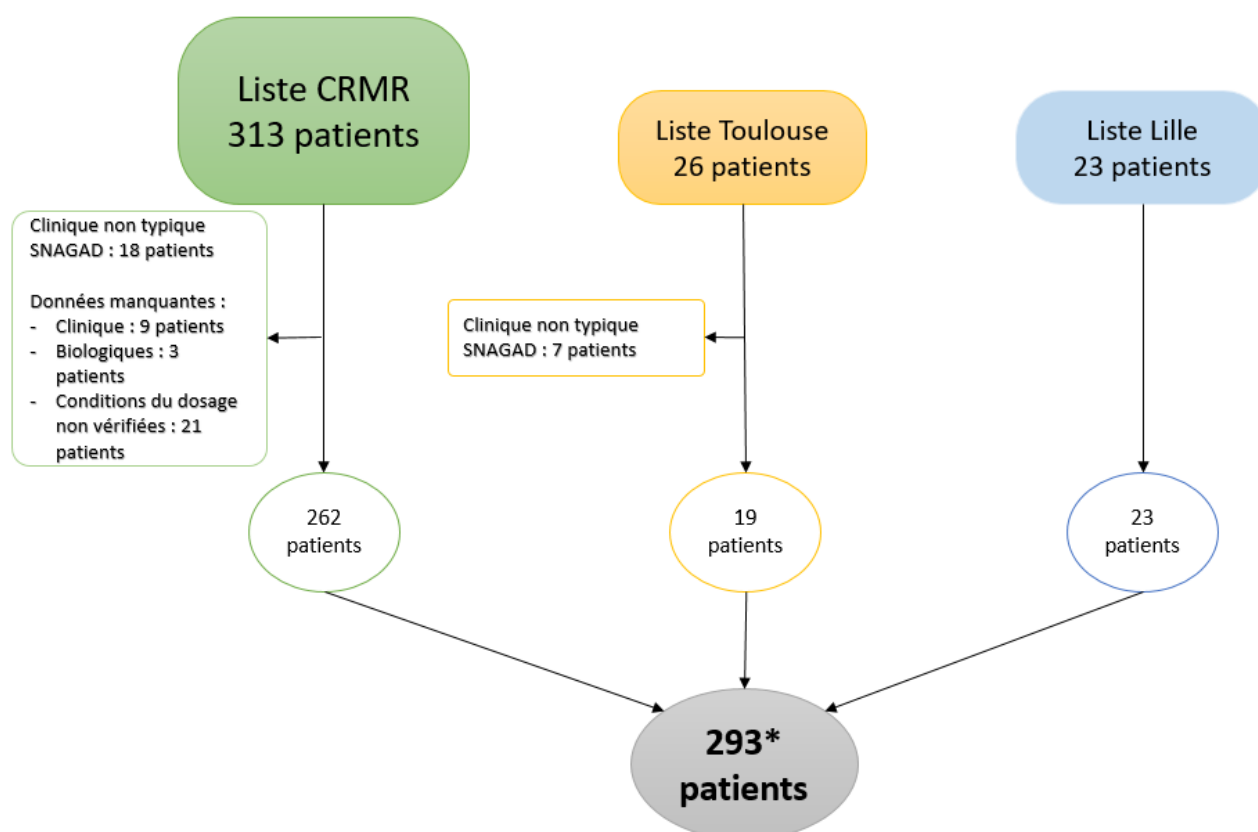


Figure 12 : Flow chart représentant les 3 bases de données permettant de définir notre population d'étude nationale.

* Le nombre 293 n'est pas l'addition des différents résultats ci-dessus mais le regroupement des 3 bases de données comprenant parfois le même individu sur 2 bases de données. Ce nombre prend donc en compte l'exclusion des doublons (n = 11).

CRMR = Centre de Référence des Maladies Rares

2 Description des populations SNAGAD nationale et Lilloise

Notre cohorte nationale est composée de 293 patients. Le sex-ratio (F/H) est de 3,4 femmes pour un homme. La moyenne d'âge est de 51,2 ans (+/- 16,6 ans) dans la cohorte nationale [Table 1].

L'EL est le syndrome clinique le plus fréquent avec 117 patients (39,9%), suivent la cérébellite avec 109 patients (37,2%), le SPR pour 91 patients (31,1%) et l'épilepsie auto-immune pour 35 patients (11,9%). Les syndromes de chevauchement concernent 55 patients (18,7%). Parmi ces derniers, la majorité des patients avec un syndrome de chevauchement (63,6%) présentent un SPR dit « plus ». L'association « SPR + cérébellite » est la plus courante suivie de « cérébellite + épilepsie » avec 23 patients (41,8% des patients avec un syndrome de chevauchement), suivie de l'association « cérébellite + épilepsie » pour 11 patients (20% des syndromes de chevauchement) [Figure 13].

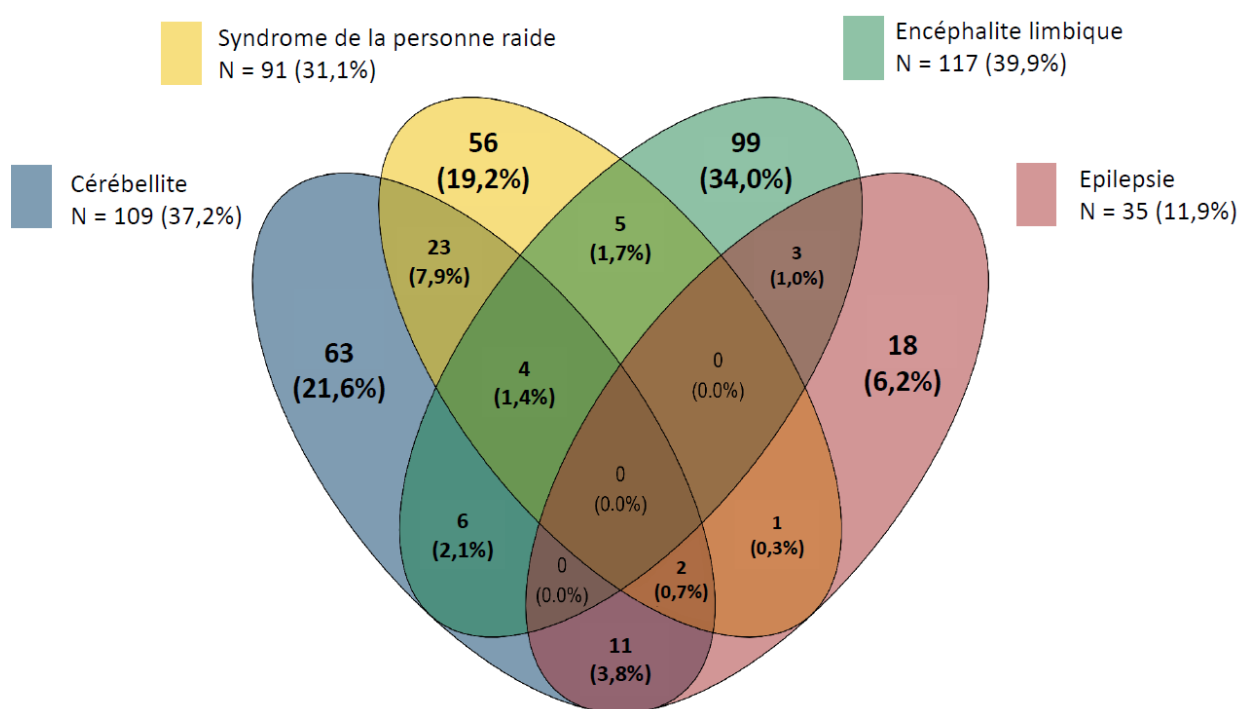


Figure 13 : Description des tableaux cliniques avec représentation des syndromes de chevauchement, au sein de la cohorte nationale de 293 patients

N : effectif

La présence d'un cancer est rapportée chez 34 patients avec 36 cancers (11.6%). Les types de cancers varient, avec une fréquence plus élevée de cancer du sein et de cancer pulmonaire [Table1]. L'âge médian des patients atteints de SNAGAD paranéoplasique est de 51 ans [39 ; 63], avec un sex-ratio de 3,1 femmes pour un homme. Chez ces 34 patients, les phénotypes cliniques les plus fréquents sont la cérébellite et le syndrome de chevauchement, chacun représentant 9 cas (26,5%), suivi par le SPR avec 8 cas (23,5%), l'EL avec 5 cas (14,7%), l'épilepsie auto-immune avec 2 cas (5,9%) et le PERM syndrome avec 1 cas (2,9%). Les informations concernant la présence de pathologies auto-immunes ne sont connues que pour la population lilloise.

Table 1: Tableau descriptif de la cohorte nationale et Lilloise

Variable			Descriptif	
Nom	Unité	Modalités	Cohorte nationale N= 293	Cohorte Lilloise N = 23
Sexe	N(%)	Femme	226 (77,1)	18 (78,2)
		Homme	67 (22,9)	5 (21,7)
Age	Moyenne $\pm$ Ecart-type en années	Age	51.2 $\pm$ 16.6	48,5 $\pm$ 17,7
Syndrome clinique	N(%)	Encéphalite limbique	117 (39,9)	2 (8,7)
		Cérébellite	109 (37,2)	15 (65,2)
		Syndrome de la personne raide	91 (31,1)	8 (34,8)
		Epilepsie auto-immune	35 (11,9)	10 (43,5)
		PERM syndrome	2 (0,6)	0 (0)
		Syndrome de chevauchement	55 (18,7)	10 (43,5)
Cancer	N(%)	Nombre de patients	34 (11,6) *	7 (30,4)
		Cancer du sein	12 (35,3)	2 (28,6)
		Cancer pulmonaire	4 (11,8)	2 (28,6)
		Carcinome papillaire thyroïdien	2 (5,9)	-
		Thymome	2 (5,9)	1 (14,3)
		Néoplasie ORL	2 (5,9)	1 (14,3)
		Cancer du col utérin	1 (2,9)	0 (0)
		Cancer de l'ovaire	1 (2,9)	0 (0)
		Tératome de l'ovaire	0 (0)	1 (14,3)
		Adénocarcinome gastrique	1 (2,9)	0 (0)
		Adénocarcinome pancréatique	1 (2,9)	0 (0)
		Cancer du caecum	1 (2,9)	0 (0)
		Lymphome du manteau recto-sigmoïdien	1 (2,9)	0 (0)
		Leucémie	1 (2,9)	0 (0)
		Lymphome non hodgkinien	1 (2,9)	0 (0)
		Lymphome de Hodgkin	1 (2,9)	0 (0)
		Lymphome de Merkel	1 (2,9)	0 (0)
		Myélome multiple indolent	1 (2,9)	0 (0)
		Mélanome	1 (2,9)	0 (0)
		Cancer du rein	1 (2,9)	0 (0)
Pathologie auto-immune	N(%)	Nombre de patients	-	12 (52,2)**
		Thyroïdite	-	8 (66,7)
		Diabète de type 1	-	4 (33,3)
		Vitiligo	-	1 (8,3)
		Polyarthrite rhumatoïde	-	1 (8,3)
		Purpura rhumatoïde	-	1 (8,3)
		PEAI	-	1 (8,3)

N : effectif en nombre de patient ; LCS : liquide cérébro-spinal ; PEAi : Polyendocrinopathie auto-immune ;

*34 patients qui présentent 36 cancers (2 patients avec 2 néoplasies).

**12 patients atteints de 16 pathologies auto-immunes car 3 patients présentent l'association d'au moins 2 pathologies auto-immunes.

Dans la population Lilloise, composée de 23 patients, le sex-ratio est de 3,6 femmes pour un homme et l'âge moyen est de 48,5 ans (+/- 17,7 ans). Comparativement à la population nationale, on observe une prédominance de cérébellite pour 15 patients (65,2%), suivi de l'épilepsie auto-immune pour 10 patients (43,5%), du SPR pour 8 patients (34,8%). Le tableau d'EL est largement minoritaire au sein de notre cohorte avec seulement 2 patients (8,7%). Les syndromes de chevauchement concernent 43,5% parmi lesquels 50% présentent un SPR « plus » [Figure 14].

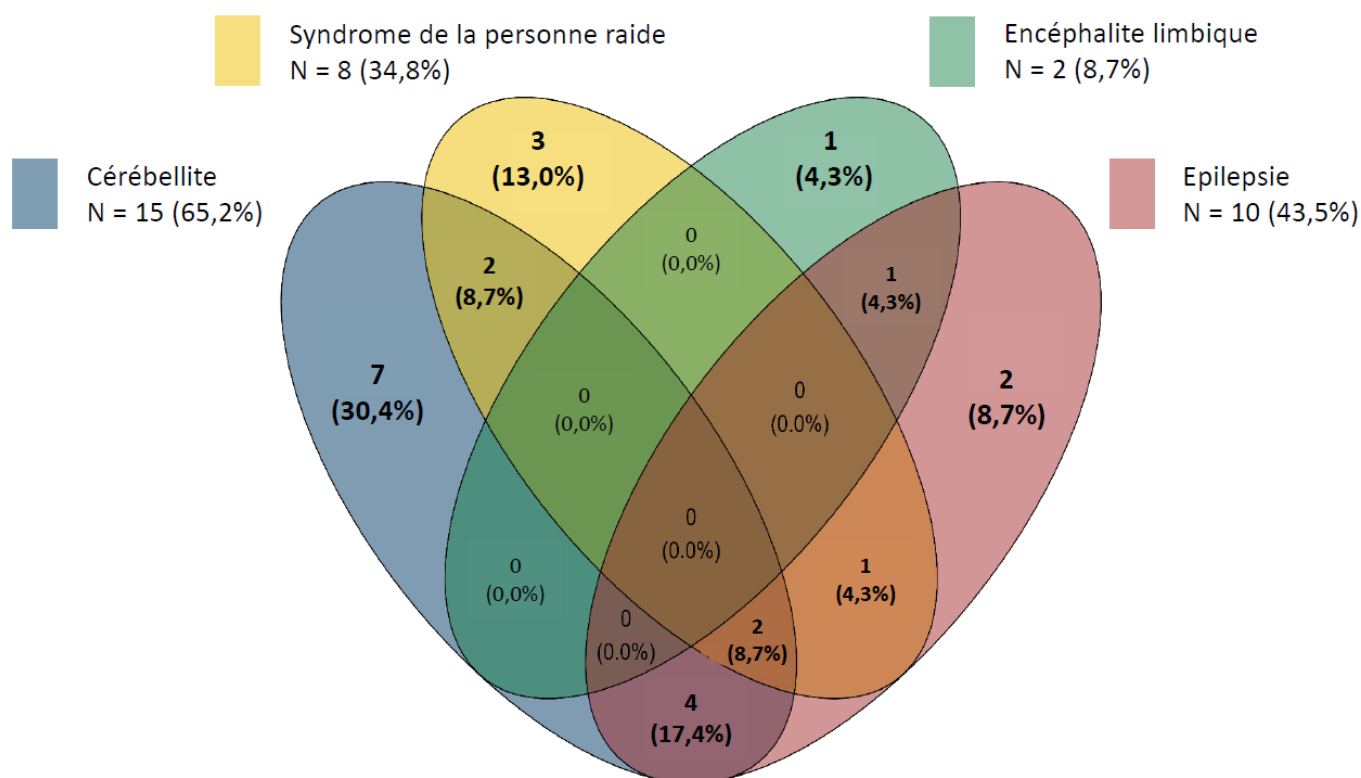


Figure 14 : Description des tableaux cliniques avec représentation des syndromes de chevauchement, au sein de la cohorte lilloise de 23 patients.

N : effectif

Comparativement à la population nationale, nous retrouvons 3 fois plus de cancer dans notre population Lilloise (30,4%). Néanmoins, les types de cancers retrouvés restent identiques avec en priorité des cancers du sein et des cancers pulmonaires [Table1].

Douze patients (52,2 %) présentent au moins une autre pathologie auto-immune extra-neurologique. Près de deux tiers de ces patients ont une thyroïdite associée (66,7%) et 33,3% un DT1. Les autres pathologies auto-immunes sont plus rares et souvent en association. Trois patients présentent au moins 2 pathologies auto-immunes associées au SNAGAD : l'un avec une thyroïdite et une polyarthrite rhumatoïde, un 2^{ème} patient présente un DT1 et une thyroïdite, et un 3^{ème} patient un DT1, un vitiligo et une polyendocrinopathie auto-immune.

3 Description des résultats des dosages d'anticorps anti-GAD au diagnostic dans la population nationale de SNAGAD

3.1 Résultats des techniques de dosage des anticorps anti-GAD (objectif primaire)

La majorité des patients ont eu un dosage de GADA réalisé dans le sérum (242 patients soit 82,6% dans la cohorte nationale et 100% dans la cohorte lilloise). La recherche de GADA s'effectue sur un couple LCS/sérum pour 61,4% des patients de la cohorte nationale et 69,6% des patients Lillois. Cinquante et un patients de la cohorte nationale (17,4%) ont eu une recherche de GADA uniquement sur le LCS ; et 62 patients (21,2%) uniquement dans le sérum. Dans la population Lilloise, 7 patients

(30,4%) ont bénéficié d'une recherche de GADA sur le sérum seul et aucun uniquement sur le LCS [Table 2].

Dans le sérum, la majorité des patients ont bénéficié de dosages par DOT (57,0%) et IFI (53,2%). Dans le LCS, l'IFI a été la méthode la plus utilisée (68,9%), suivie du CBA (34,1%) et du DOT (32,8%). L'utilisation du RIA est particulièrement notable dans la cohorte Lilloise, notamment dans le sérum, où il est prédominant avec 73,9% des patients qui ont bénéficié d'un dosage en RIA, tandis qu'il est peu courant au niveau national, ne concernant que 7,2% des patients. D'ailleurs, ces patients correspondent principalement à nos patients Lillois au sein de notre cohorte nationale ($17/21 = 80,9\%$). Les techniques de CBA et d'ELISA sont davantage utilisées dans la cohorte nationale. Le DOT et l'IFI sont utilisés de manière similaire dans les cohortes nationale et Lilloise. Néanmoins, le DOT est plus fréquemment employé dans le LCS à Lille qu'au sein de notre cohorte nationale [Table 2].

Cette répartition des techniques souligne des différences entre les pratiques locales et nationales, avec un recours au RIA particulièrement marqué à Lille, mais une proportion relativement similaire de DOT et d'IFI entre les 2 cohortes.

Table 2 : Description des techniques de dosage réalisées par patient au diagnostic dans la cohorte nationale et Lilloise

Variable			Descriptif	
Nom	Unité	Modalités	Cohorte nationale N = 293	Cohorte Lilloise N = 23
Matrice	N(%)	LCS	231 (78,8)	16 (69,5)
		Sérum	242 (82,6)	23 (100,0)
		Couple LCS + sérum	180 (61,4)	16 (69,6)
		LCS seul	51 (17,4)	0 (0,0)
		Sérum seul	62 (21,2)	7 (30,4)
Technique dans le sérum	N(%)	CBA	70 (23,9)	2 (8,7)
		CLIA	5 (1,7)	0 (0)
		DOT	167 (57,0)	12 (52,2)
		ELISA	121 (41,3)	2 (8,7)
		IFI	156 (53,2)	13 (56,5)
		RIA	21 (7,2)	17 (73,9)
Technique dans le LCS	N(%)	CBA	100 (34,1)	3 (13,0)
		CLIA	0 (0,0)	-
		DOT	96 (32,8)	11 (47,8)
		ELISA	120 (41,0)	1 (4,3)
		IFI	201 (68,9)	11 (47,8)
		RIA	8 (2,7)	8 (34,8)

N : effectif en nombre de patients ; LCS : liquide cérébro-spinal

Un patient a pu bénéficier de plusieurs techniques de dosage ou de plusieurs fois la même technique dans la même matrice. Cela explique le total de 589 tests réalisés sur le sérum et 558 sur le LCS.

Ainsi, si on se réfère au nombre total de tests réalisés, les 2 techniques majoritairement utilisées dans le sérum sont l'IFI avec 184 tests (31,2%), le DOT avec 183 tests (31,1%), ensuite l'ELISA avec 126 tests (21,4%), le CBA avec 70 tests (11,9%) et le RIA avec 21 dosages (3,6%) [Figure 15A]. Dans le LCS, l'IFI est la technique la plus utilisée avec 225 tests (40,3%), suivi de l'ELISA avec 123 tests (22,1%), le DOT avec 102 tests (18,3%) et enfin le CBA avec 100 tests (17,9%). L'utilisation du RIA est plus rare dans le LCS puisqu'il n'est réalisé que dans 1,4% des cas [Figure 15B]. Le CLIA

représente 0,8% des dosages sériques et, il n'y a aucun dosage dans le LCS dans notre cohorte.

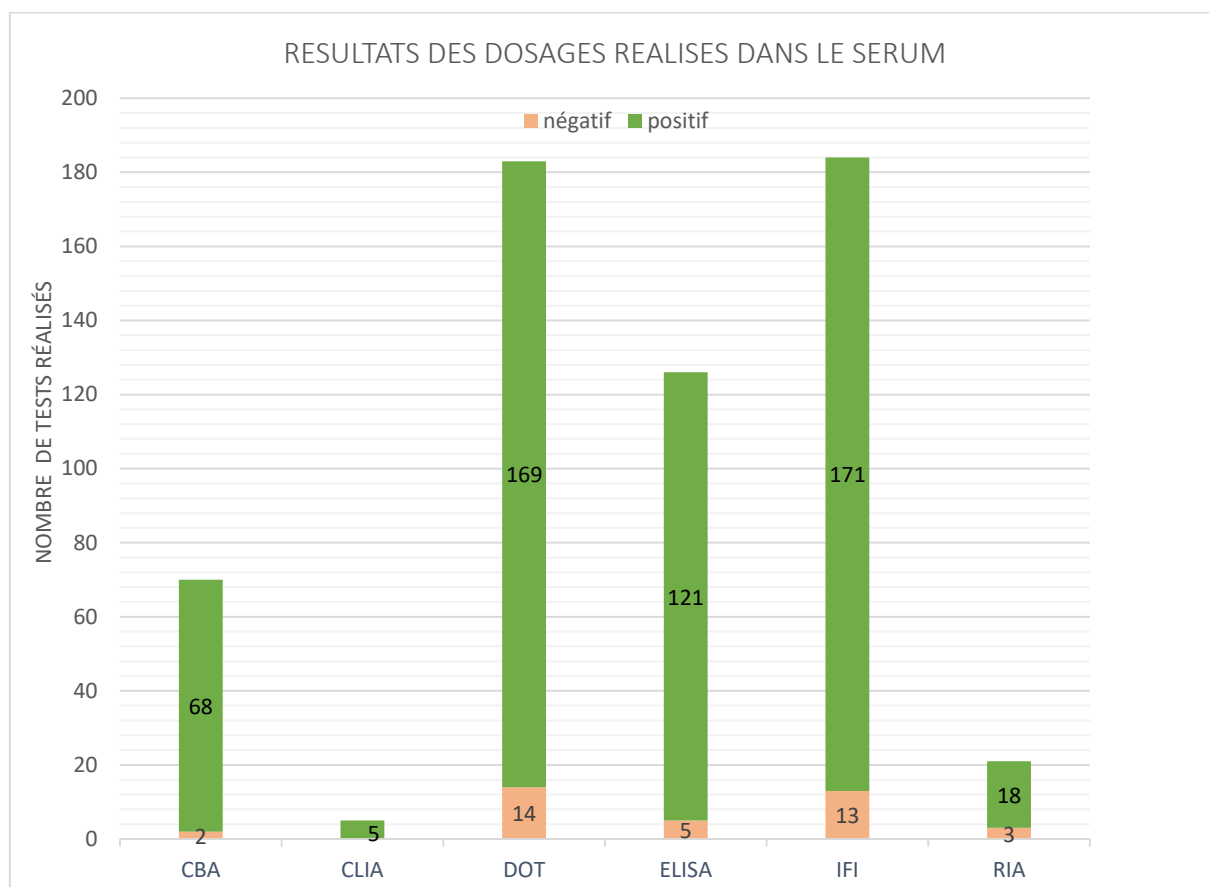


Figure 15A: Histogramme des dosages réalisés dans le sérum au sein de la cohorte nationale de 293 patients. Total de tests réalisés $N = 589$

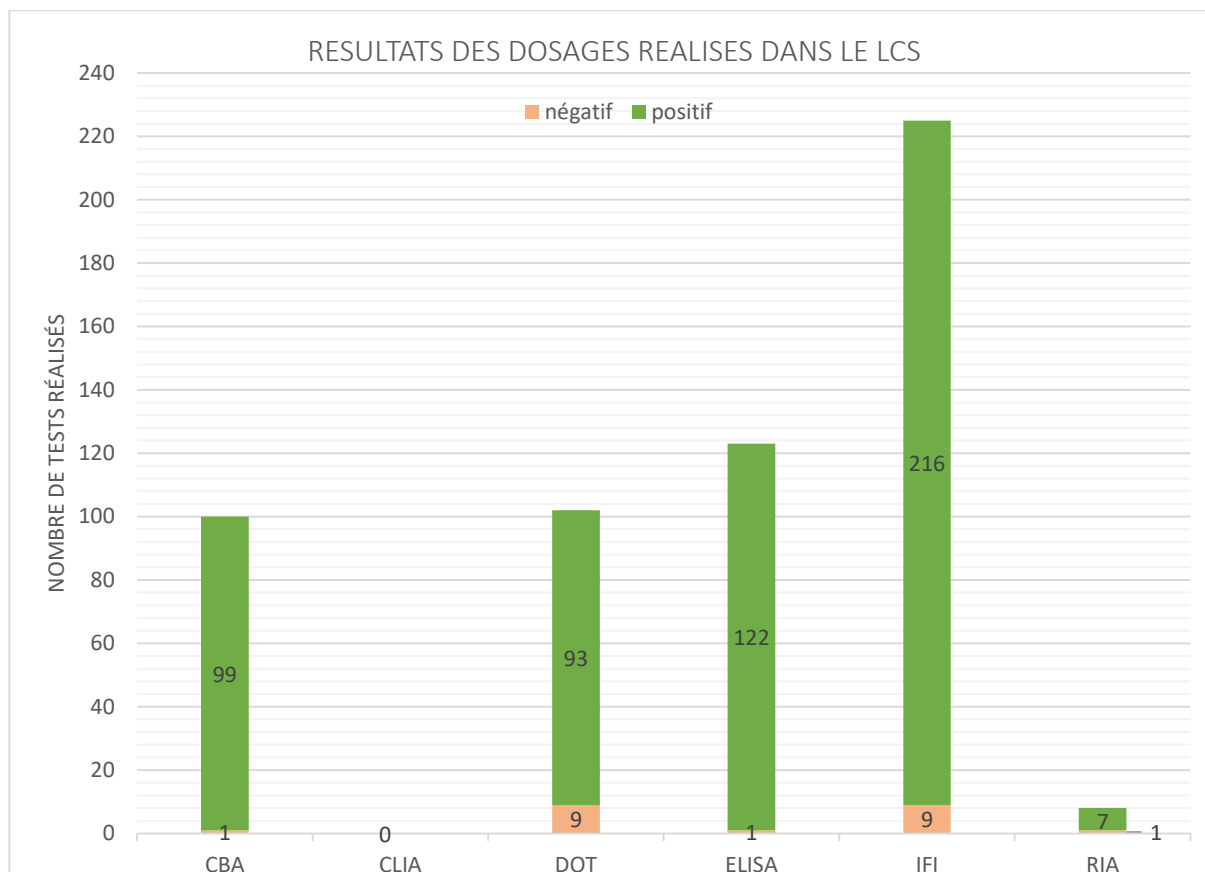


Figure 15B: Histogramme des dosages réalisés dans le LCS au sein de la cohorte nationale. Total de tests réalisés $N = 558$

Tous les CLIA réalisés dans le sérum sont positifs. Au sein des CBA, 68 dosages (97,1%) sont positifs dans le sérum et 99 dosages (99%) sont positifs dans le LCS. L'ELISA est positif pour 121 tests (96%) dans le sérum et pour 122 tests (99,2%) dans le LCS. L'IFI est positive pour 171 tests (93.0 %) dans le sérum et 216 tests (96.0%) dans le LCS. Les DOT sont positifs dans 169 cas (92,3%) dans le sérum et dans 93 cas (91,2%) dans le LCS. Enfin, le RIA est positif pour 18 dosages (85,7%) dans le sérum et 7 dosages (87,5%) dans le LCS [Figures 15A et 15B].

Concernant les dosages quantitatifs, les marques retrouvées pour les tests ELISA dans notre cohorte sont les suivants : Medipan®, Aeskulisa®, RSR Limited®, Euroimmun®, Medizym®, Biomerica®.

Dans le sérum, nous disposons de 121 tests ELISA positifs dont 10 pour lesquels le titre est inconnu. Parmi ces 111 tests, 91% (101 dosages) atteignent le seuil maximal de détection et 9% (10 dosages) sont dans les bornes de détection. Le détail des résultats par kit est le suivant :

- Kit Medipan® : Sur 74 résultats, seul un résultat quantifiable est à 27.8 UI/mL, tandis que les autres sont au seuil maximal de titration 250 UI/mL,
- Kit Aeskulisa ® : 4 résultats tous au seuil max de de 500UI/mL.
- Kit RSR Limited® : sur 17 résultats, un titre quantifiable à 1291 UI/mL, tous les autres au seuil max de à 2000 Ui/mL,
- Kit Euroimmun® : Sur 8 résultats, un retrouve un titre à 1310 UI/mL, tous les autres au seuil max de 2000 UI/mL,
- Kit Biomerica® : Sur 2 résultats, les concentrations sont respectivement de 1215 et 1239 UI/mL, avec un seuil maximal de détection de 2000 UI/mL.
- Kit Medizym® : Sur 6 résultats, 5 présentent une concentration médiane de 164 000 UI/mL [157 900 ; 683 000]. Les valeurs s'étendent de 110 000 UI/mL à un maximum de 1 400 000 UI/mL. Le seuil maximal de détection de ce kit est de 200 000 UI/mL, ce qui a donc nécessité des dilutions itératives pour obtenir des titres précis au-delà de ce seuil. Cependant, les détails des dilutions effectuées ne sont pas disponibles.

Dans le LCS, nous disposons de 122 tests ELISA positifs dont 8 pour lesquels le titre est inconnu. Sur 114 résultats quantitatif en ELISA, 102 (89,5%) atteignent le seuil maximal de détection et 12 (10,5%) sont dans les bornes de détection. Les seuils de détection sont identiques à ceux définis dans le sérum. Les détails des résultats sont les suivants :

- Kit Medipan® : Sur 98 résultats, 2 présentent un titre de 11,8 et 135,1 UI/mL, et les autres sont au seuil maximum (seuil maximal de 250 UI/mL),
- Kit RSR Limited® : Sur 8 résultats, 5 présentent un titre dans la borne de détection, avec une médiane de 1433,3 UI/mL [23.2 ; 2466]. Les autres sont au seuil maximal de à 2000 UI/mL.
- Kit Euroimmun® : Sur 3 résultats, un retrouve un titre à 1384 UI/MI et les 2 autres sont au seuil maximal de 2000 UI/mL.
- Kit Medizym® : Sur 5 résultats, 4 sont dans les bornes de détection, avec une médiane de 11 750 UI/mL [4 975 ; 21 370], le dernier est au seuil maximal de 500UI/ml.

Les marques retrouvées pour les tests RIA sont Medipan® et CisBioInternational®. Parmi les 18 dosages sériques de RIA revenus positifs, nous n'avons des valeurs quantitatives que pour 14 d'entre eux, dont 10 (71,4%) qui sont dans les bornes de détection et 4 (28,6%) qui atteignent le seuil de maximal de détection. Les détails par kit sont les suivants :

- Kit Medipan® : Sur 4 résultats, 3 sont dans les bornes de détection avec une médiane à 107 UI/mL [106 ; 134], pour un seuil maximal de 250 UI/mL,
- Kit CisBioInternational® : 7 résultats avec une médiane de 95,3 UI/mL [31,5 ; 134,2], pour un seuil maximal de 300UI/mL.

Les résultats dans le LCS sont relativement similaires avec un seul résultat supérieur au seuil maximal de détection et 6 (85.7%) dans la borne de détection du kit CisBioInternational®, avec une médiane de 100,4 UI/mL [22,8 ; 145,3].

3.2 Répartition des techniques de dosage des anticorps anti-GAD au cours du temps

Ces résultats sont représentés dans les figures 15 et 16. Cette analyse porte sur 291 patients, entre octobre 1998 et novembre 2023, 2 patients ont été exclus car diagnostiqués en 2024 dans les centres de Lille et Toulouse. Le nombre de tests réalisés sur cette période est de 584 tests dans le sérum et 554 dans le LCS.

On observe une augmentation du nombre de dosages mais aussi de la diversité des tests réalisés que ce soit dans le sérum ou dans le LCS [Figure 16A et 17A]. La majorité des dosages a été réalisée entre 2019 et 2023 avec 377 tests (64.6%) dans le sérum et 359 tests (64.8%) dans le LCS. Seul 10% des dosages dans le sérum ont été réalisés entre 1998 et 2013 avec 9 dosages (1.5%) entre 1998 et 2003, 10 dosages (1,7%) entre 2004 et 2008, et 40 dosages (6.8%) entre 2008 et 2013. Respectivement dans le sérum et le LCS, les dosages réalisés entre 1998 et 2013 représentent 10% (n=59) et 6.0% des dosages (n=33). Puis entre 2014 et 2018, on voit une augmentation avec 148 dosages (25,3%) réalisés dans le sérum et 162 dosages (29,2%) dans le LCS.

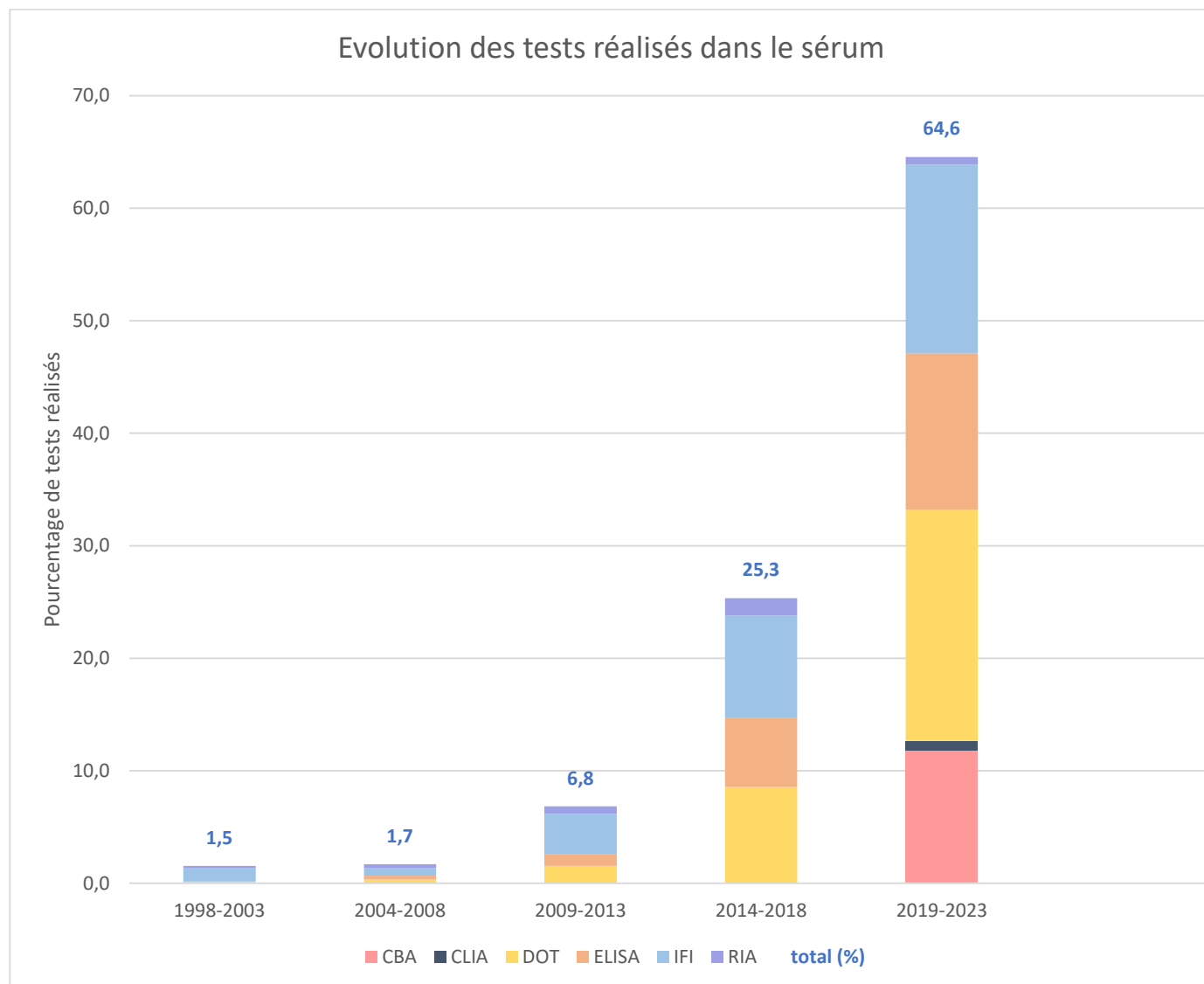


Figure 16A: Histogramme du nombre des tests dans le sérum entre 1998 et 2023.

Total de tests réalisés $N = 584$

Nombre de tests réalisées par période :

CBA : 1998-2003 : 0 dosage (0%), 2004- 2008 : 0 dosage (0%), 2009-2013 : 0 dosage (0,0%), 2014-2018 : 0 dosage (0%), 2019-2023 : 69 dosages (11,8%)

CLIA : 1998-2003 : 0 dosage (0%), 2004- 2008 : 0 dosage (0%), 2009-2013 : 0 dosage (0,0%), 2014-2018 : 0 dosage (0%), 2019-2023 : 5 dosages (0,9%)

DOT : 1998-2003 : 1 dosage (0,2%), 2004- 2008 : 2 dosages (0,3%), 2009-2013 : 9 dosages (1,5%), 2014-2018 : 50 dosages (8,6%), 2019-2023 : 120 dosages (20,5%)

ELISA : 1998-2003 : 0 dosage (0%), 2004- 2008 : 2 dosages (0,3%), 2009-2013 : 6 dosages (1,0%), 2014-2018 : 36 dosages (6,2%), 2019-2023 : 81 dosages (13,9%)

IFI : 1998-2003 : 7 dosages (1,2%), 2004- 2008 : 4 dosages (0,7%), 2009-2013 : 21 dosages (3,6 %), 2014-2018 : 53 dosages (9,1%), 2019-2023 : 98 dosages (16,8%)

RIA : 1998-2003 : 1 dosage (0,2%), 2004- 2008 : 2 dosages (0,3%), 2009-2013 : 4 dosages (0,7 %), 2014-2018 : 9 dosages (1,5%), 2019-2023 : 4 dosages (0,7%)

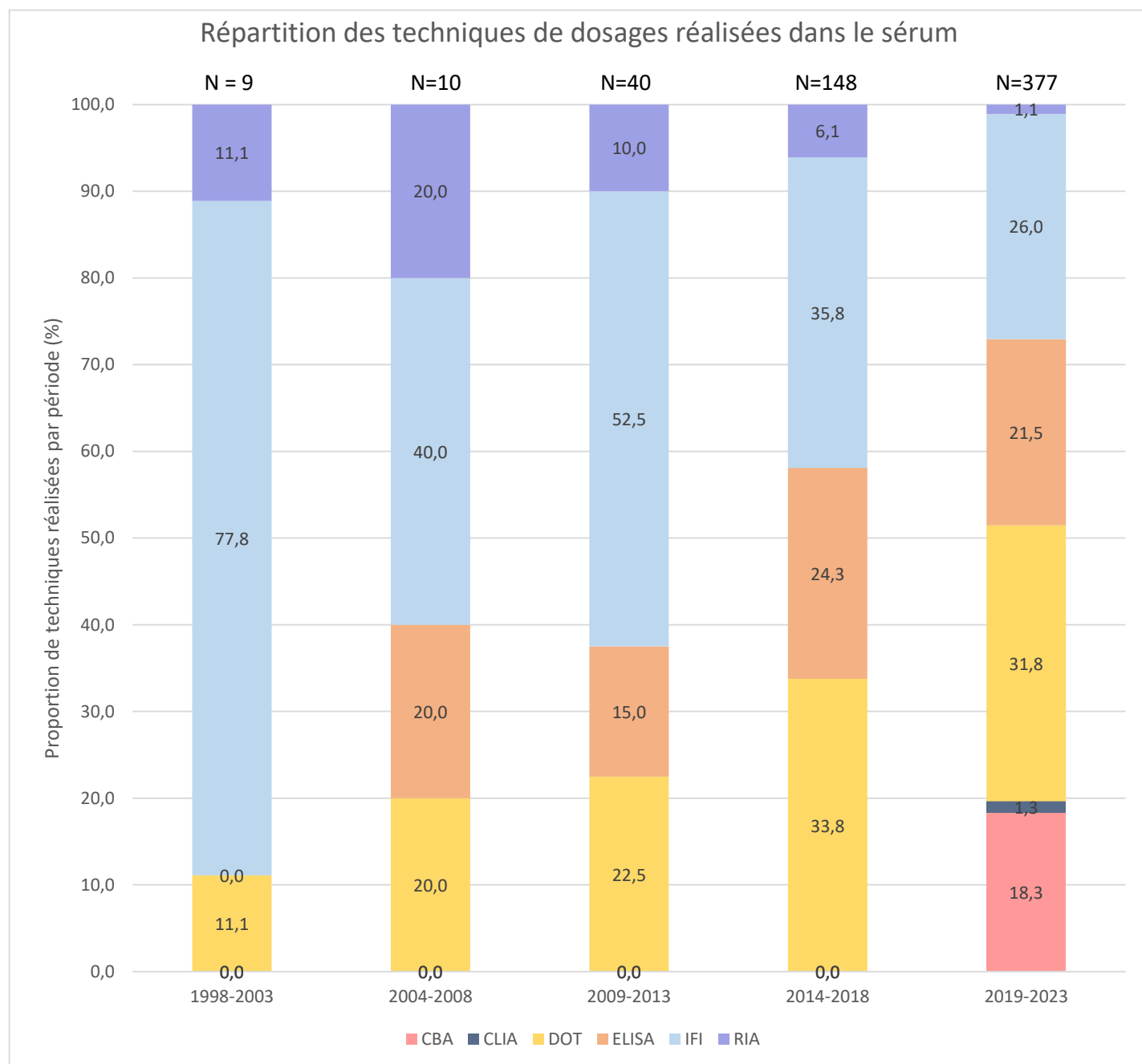


Figure 16B : Histogramme de répartition des techniques de dosage réalisées dans le sérum entre 1998 et 2023, sous forme de pourcentage sur le total de tests sur la période.

Total de tests réalisés $N = 584$

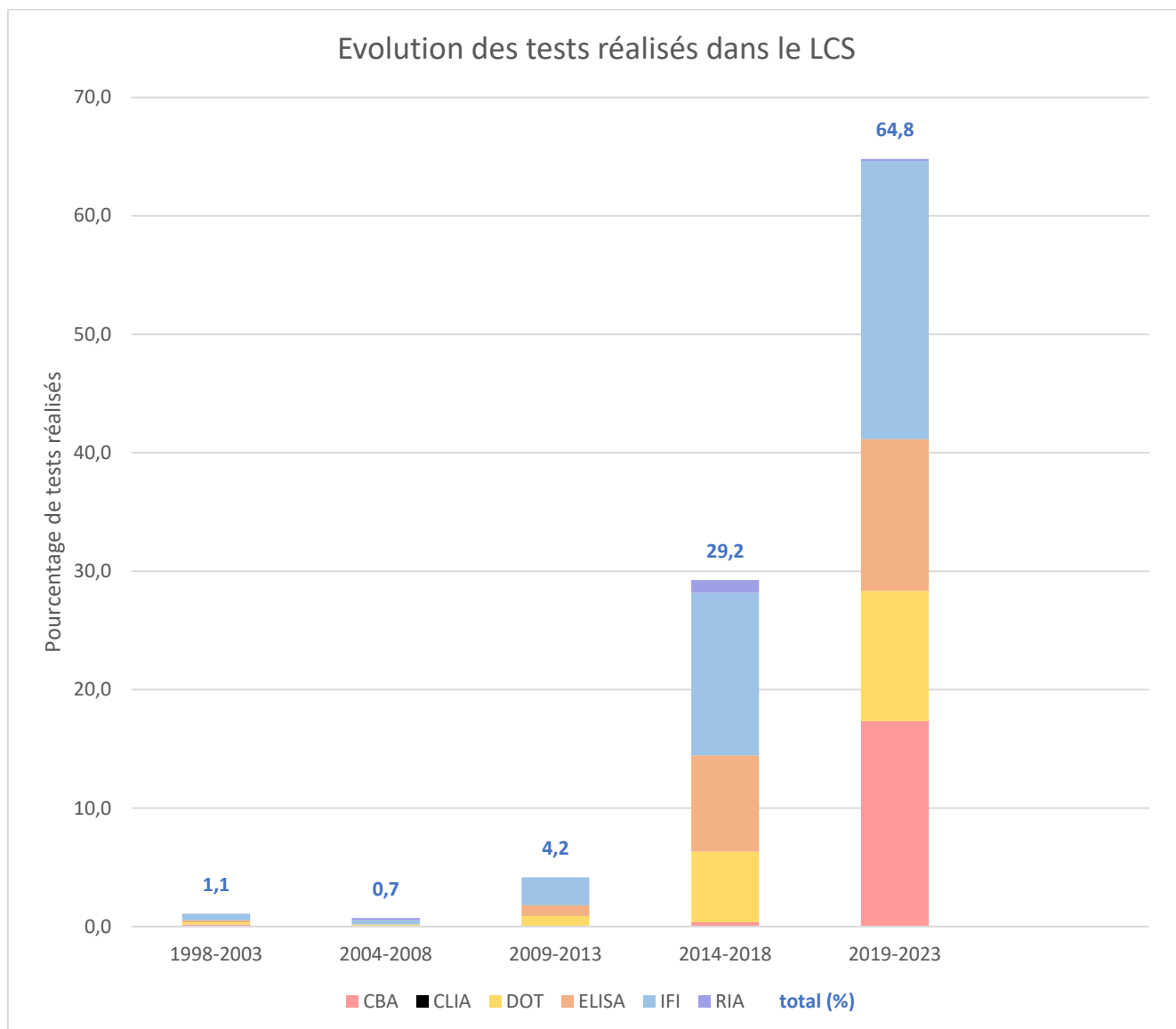


Figure 17A : Histogramme de répartition des tests dans le LCS entre 1998 et 2023.

Total de tests réalisés $N = 554$

Nombre de tests réalisées par période :

CBA : 1998-2003 : 1 dosage (0,2%), 2004- 2008 : 0 dosage (0%), 2009-2013 : 0 dosage (0,0%), 2014-2018 : 2 dosages (0,4%), 2019-2023 : 96 dosages (17,3%)

CLIA : aucun dosage dans le LCS.

DOT : 1998-2003 : 1 dosage (0,2%), 2004- 2008 : 1 dosage (0,2%), 2009-2013 : 5 dosages (0,9%), 2014-2018 : 33 dosages (6,0%), 2019-2023 : 61 dosages (11,0%)

ELISA : 1998-2003 : 1 dosage (0,2%), 2004- 2008 : 0 dosage (0%), 2009-2013 : 5 dosages (0,9%), 2014-2018 : 45 dosages (8,1%), 2019-2023 : 71 dosages (12,8%)

IFI : 1998-2003 : 3 dosages (0,5%), 2004- 2008 : 2 dosages (0,4%), 2009-2013 : 13 dosages (2,3 %), 2014-2018 : 76 dosages (13,7%), 2019-2023 : 130 dosages (23,5%)

RIA : 1998-2003 : 0 dosage (0%), 2004- 2008 : 1 dosage (0,2%), 2009-2013 : 0 dosage (0 %), 2014-2018 : 6 dosages (1,0%), 2019-2023 : 1 dosage (0,2%)

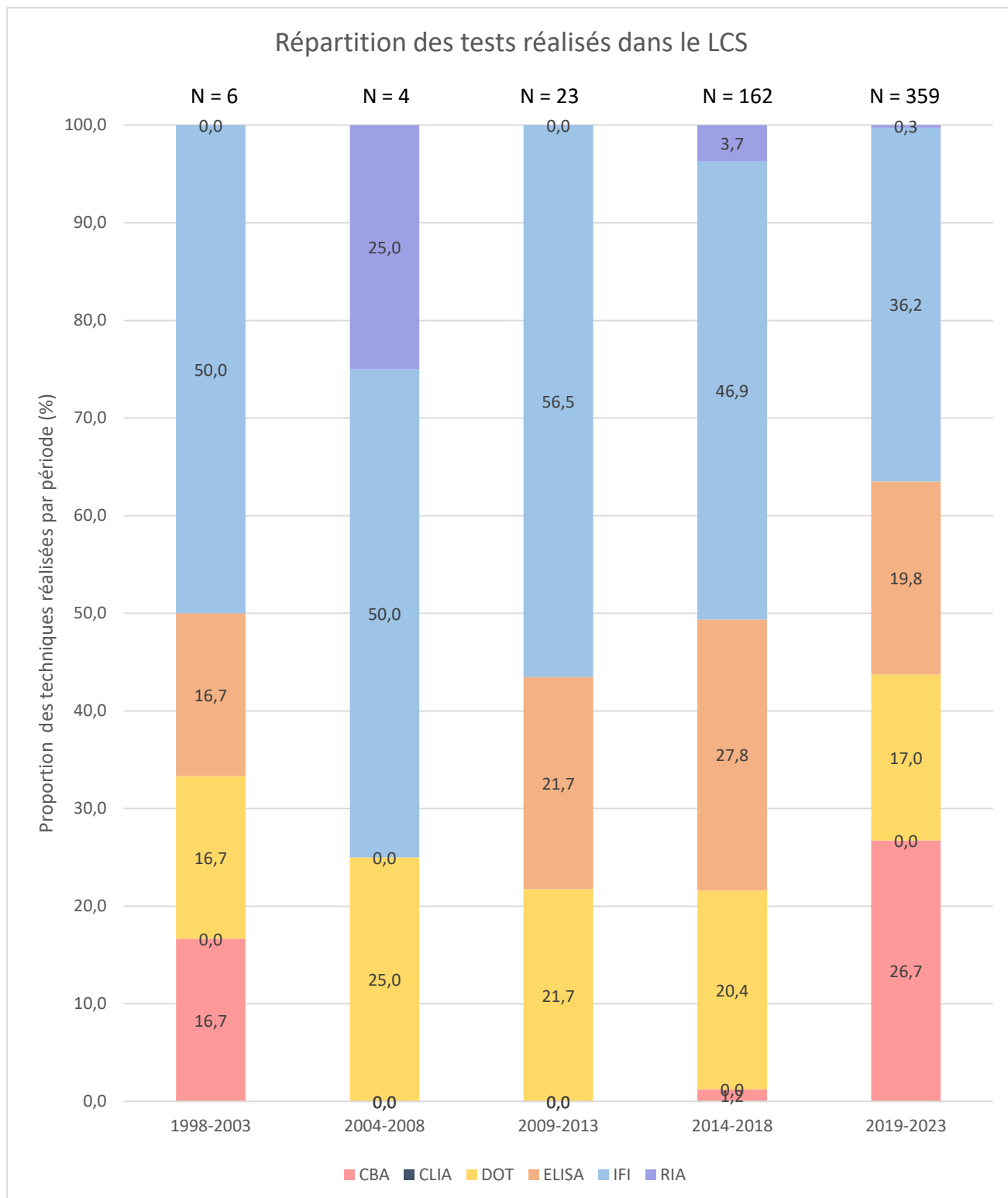


Figure 17B : Histogramme de répartition des techniques de dosage réalisées dans le LCS entre 1998 et 2023, sous forme de pourcentage sur le total de tests sur la période.

Total de tests réalisés $N = 554$

En examinant la répartition des techniques par période, on observe l'apparition du CBA sur la période de 2019 à 2023 qui représentent 11,8% des dosages sériques (n=69) et 17,3% des dosages dans le LCS (n=96). L'ELISA est utilisé après 2003 dans une proportion relativement stable dans le temps, autour de 20% tant dans le sérum que dans le LCS [Figure 16B et 17B].

Dans le sérum, l'IFI était la principale technique utilisée entre 1998 et 2003 puis diminue en proportion progressivement au cours du temps. Toujours à partir de 2004, la répartition entre le DOT et l'ELISA s'établit de manière globalement stable, avec des proportions variant entre 20% et 33,8% pour le DOT et 15% et 24,3% pour l'ELISA [Figure 16B].

Dans le LCS, l'IFI reste la plus fréquemment réalisée, représentant la moitié des dosages entre 1998 et 2014 avec une décroissance relative après 2014, parallèle à l'augmentation des CBA à partir de cette période. La proportion de DOT, quant à elle, reste relativement stable autour de 20 % [Figure 17B].

3.3 Analyses de concordance et reproductibilité des techniques de dosage des anticorps anti-GAD réalisées au diagnostic : analyses de sous-groupe

Sous-groupe 1 : Concordance inter-test, de techniques différentes au sein d'une même matrice.

Dans le sérum, les résultats sont représentés dans la figure 18A. Les différentes techniques de dosage, à savoir le CBA, le DOT, l'ELISA, et l'IFI montrent une forte concordance dans les résultats pour les échantillons testés. L'ensemble des techniques utilisées dans le sérum ont une concordance inter-test de plus de 90%.

Le CBA montre un fort taux de concordance positive avec les autres tests, notamment avec le DOT à 96,5%, l'ELISA à 97,7%, et l'IFI à 96,2%. Il n'y a aucun cas de concordance négative observée. Les discordances concernent de très faible proportion de patients avec 3,5% des cas avec le DOT, 2,3% des cas avec l'ELISA et 3,8% avec l'IFI.

Les méthodes DOT et ELISA affichent également une concordance positive importante avec l'IFI, respectivement de 91,5% et 90%, bien que quelques cas de discordances existent, particulièrement entre l'ELISA et l'IFI (8,6% de discordance).

Le RIA n'a été utilisé que sur un faible nombre de patients, ce qui limite l'interprétation des résultats comparatifs avec les autres techniques. Les concordances positives observées dans les échantillons disponibles restent relativement élevées bien qu'elles soient limitées par le nombre d'échantillons (seulement 2 cas de RIA associés à une ELISA dans le sérum).

Concernant les cas de concordances négatives, ils restent minoritaires et représentent 1,7% des cas de dosage en IFI et en DOT ; 1,4% des cas de dosage en ELISA et en IFI ; et 16,6% des cas de dosage RIA et IFI.

Dans le LCS, les résultats sont décrits dans la figure 18B. L'ensemble des techniques utilisées ont une concordance inter-test supérieure à 90%, sauf le CBA et le DOT. Les résultats obtenus dans le LCS sont globalement similaires à ceux du sérum, toujours avec un nombre limité de dosages réalisés en RIA.

SERUM		CBA		DOT		ELISA		IFI		RIA	
		Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)
CBA	Total	N= 1									
	Positif N(%)	0 (0)									
	Négatif N(%)	1 (100)	0 (0)								
DOT	Total	N = 57		N = 16							
	Positif N(%)	55 (96,5)	2 (3,5)	12 (75,0)							
	Négatif N(%)	0 (0)	0 (0)	4 (25,0)	0 (0)						
ELISA	Total	N = 44		N = 90		N = 5					
	Positif N(%)	43 (97,7)	1 (2,3)	83 (92,2)	3 (3,3)	5 (100)					
	Négatif N(%)	0 (0)	0 (0)	4 (4,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)				
IFI	Total	N = 52		N = 117		N = 70		N = 28			
	Positif N(%)	50 (96,2)	1 (1,9)	107 (91,5)	4 (3,4)	63 (90,0)	2 (2,9)	26 (92,9)			
	Négatif N(%)	1 (1,9)	0 (0)	4 (3,4)	2 (1,7)	4 (5,7)	1 (1,4)	2 (7,1)	0 (0)		
RIA	Total	N = 1		N = 7		N = 2		N = 6		N = 0	
	Positif N(%)	0 (0)	1 (100)	6 (85,7)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	5 (83,4)	0 (0)	0 (0)	
	Négatif N(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,6)	0 (0)	0 (0)

Figure 18A : Description des résultats du dosage des GADA entre différentes techniques dans le sérum *N = effectif*

L'IFI dans le LCS montre des concordances positives les plus élevées avec les autres techniques, notamment avec le CBA et l'ELISA (100%), le DOT (93,6%) et enfin le RIA (66,7%). L'ELISA et le DOT présentent également des concordances positives supérieures à 90%. Pour le CBA, seul l'association avec le DOT retrouve une concordance positive inférieure à 90% (87,2%).

Les cas de discordances sont rares sauf entre le CBA et le DOT où les résultats sont discordants dans 12,8% des cas.

Enfin, sur l'ensemble des dosages présentés dans le LCS, un seul cas de concordance négative a été observé entre l'IFI et le DOT.

LCS		CBA		DOT		ELISA		IFI		RIA	
		Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)
CBA	Total	N= 0									
	Positif N(%)	0 (0)									
	Négatif N(%)	0 (0)	0 (0)								
DOT	Total	N = 39		N = 6							
	Positif N(%)	34 (87,2)	1 (2,6)	5 (83,3)							
	Négatif N(%)	4 (10,2)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)						
ELISA	Total	N = 55		N = 52		N = 3					
	Positif N(%)	54 (98,2)	1 (1,8)	49 (94,2)	3 (5,8)	2 (66,7)					
	Négatif N(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)				
IFI	Total	N = 89		N = 78		N =102		N = 24			
	Positif N(%)	89 (100,0)	0 (0)	73 (93,6)	4 (5,1)	102 (100,0)	0 (0)	17 (70,8)			
	Négatif N(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)	0 (0)	0 (0)	7 (29,2)	0 (0)		
RIA	Total	N= 0		N= 3		N= 0		N= 3		N= 0	
	Positif N(%)	0 (0)	0 (0)	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	
	Négatif N(%)	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Figure 18B : Description des résultats du dosage des GADA entre différentes techniques dans le LCS.

N = effectif

Sous-groupe 2 : Concordance inter-matrice d'une même technique.

Les résultats sont présentés dans la figure 19.

LCS \ SERUM	CBA		DOT		ELISA		IFI		RIA	
	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)	Positif N(%)	Négatif N(%)
Nombre de patients*	N = 54		N = 76		N = 66		N = 87		N = 7	
Positif N(%)	50 (92,5)	1 (1,9)	66 (86,8)	3 (4,0)	64 (97,0)	2 (3,0)	82 (94,3)	3 (3,5)	5 (71,4)	2 (28,6)
Négatif N(%)	2 (3,7)	1 (1,9)	3 (4,0)	4 (5,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)

Figure 19 : Description des résultats du dosage des GADA par une même technique entre différentes matrices (sérum vs LCS)

*Les patients ayant eu deux tests par la même technique (« doublons ») avec des résultats discordants sont exclus de cette analyse

En gras : les patients positifs LCS mais négatifs sérum, n=11

Cinquante-quatre patients ont bénéficié d'un CBA dans le sérum et le LCS, avec des résultats concordants positifs pour 50 patients (92.5%). Une proportion minime de discordance existe entre le sérum et le LCS (5.6%), dont 2 avec des résultats positifs dans le sérum mais négatifs dans le LCS.

Pour les DOT (n = 76), 86.8% des résultats étaient concordants positifs et 5.2% d'entre eux avaient des résultats concordants négatifs. Les résultats étaient discordants pour 8%. Pour les patients ayant un DOT positifs dans le sérum (n = 69), 95,7% avaient aussi un résultat positif dans le LCS.

Pour les ELISA (n = 66), tous les patients avec un ELISA positifs dans le sérum l'étaient dans le LCS (n = 64), mais 2 patients avaient un résultat positif dans le LCS alors qu'il était négatif dans le sérum. On observe donc des résultats positifs concordants dans 97% des cas et seulement 3% de discordance.

Pour les IFI (n = 87), les résultats montrent une concordance inter-matrice de 95,4%. Lorsqu'un patient a une IFI positive dans le sérum (n = 83), 98,8% d'entre eux l'ont aussi positive dans le LCS. Seulement 4,6% des patients ont des résultats discordants en IFI entre les deux matrices.

Étant donné le faible effectif (n = 7), l'analyse de la concordance inter-matrice en RIA présente une valeur limitée.

Au total, l'ELISA semble présenter la meilleure concordance inter-matrice. Lorsqu'un patient a bénéficié d'un ELISA dans le sérum et dans le LCS, les résultats sont concordants dans 97% des cas. L'IFI, le CBA et le DOT ont des taux de concordance respectivement de 95,4%, 94,4% et 92%. Le phénotype clinique des patients ayant une discordance avec un test positif uniquement dans le LCS (n=11) est principalement une EL pour 5 d'entre eux.

Sous-groupe 3 : Reproductibilité d'une même technique sur une même matrice.

Les résultats des « doublons » sont représentés en couleur dans les figures 18A et 18B.

Dans le sérum, 16 patients ont été testés en DOT (en jaune) à 2 reprises au diagnostic. Parmi eux, 12 patients ont eu des résultats positifs concordants, tandis que 4 ont des résultats discordants. Vingt-six patients soit 92,9% des patients ayant bénéficié de deux IFI dans le sérum (en bleu) obtiennent un même résultat. Seulement 2 patients ont des résultats discordants. Seul, respectivement, 1 et 5 patients ont bénéficié de deux CBA et ELISA dans le sérum durant la phase de diagnostic. Du fait d'un très faible effectif, nous avons décidé de ne pas analyser leur résultat.

Dans le LCS, aucun patient n'a bénéficié de plusieurs CBA ou RIA. Seul 6 patients ont bénéficié d'au moins deux dosages DOT et 3 patients pour l'ELISA. On retrouve 24 patients ayant bénéficié de 2 IFI, en grande majorité, une dans le centre préleveur et une au CRMR de Lyon, dont 17 gardent un résultat positif, soit une reproductibilité de 70,8%. Les 7 patients restant présentent pour 6 d'entre eux un résultat positif au CRMR et négatif dans le centre initial et un seul patient un résultat négatif au CRMR versus positif dans le centre initial.

Au total, nous ne disposons pas de suffisamment de données répétées sur une même matrice pour conclure sur la reproductibilité d'une même technique sur une même matrice.

3.4 Estimation des valeurs de performance des techniques de dosage des anticorps anti-GAD

Afin d'estimer les valeurs de performance, nous avons analysé une population de patients témoins composés de 49 patients de la région Lilloise, d'âge moyen 40,5 ans ($\pm 13,1$) et un sex ratio de 2,5 femmes pour 1 homme. Quarante-quatre sujets ont bénéficié d'un prélèvement de sérum et de LCS au diagnostic d'une autre maladie inflammatoire : la sclérose en plaque (SEP). Les 5 autres présentaient une autre maladie non inflammatoire : myasthénie auto-immune, myélopathie cervico-arthrosique associée à une carence en B12, état de mal migraineux, et 2 cas de situation non inflammatoire (un patient avec un symptôme urinaire d'étiologie périphérique et un patient avec trouble visuel d'étiologie indéterminé).

Aucun de ces 49 patients témoins ne retrouvent de marquage de GADA en IFI dans le sérum comme dans le LCS. Tous les DOT LCS réalisés dans cette population sont

négatifs. Cinq patients témoins ont des résultats positifs dans au moins une des 4 techniques utilisées, dans le sérum et/ou le LCS :

- Témoin - SEP1 : positif en ELISA dans le sérum à un titre de 33,2 UI/mL et en RIA à 15,9 UI/mL, et dans le LCS faiblement positif à 0,8 UI/mL. Les résultats en DOT et en IFI sont négatifs dans le sérum et le LCS,
- Témoin - SEP2 : positif en RIA dans le sérum à 1 UI/mL, mais négatif dans le LCS. En raison d'une quantité de prélèvement insuffisante, l'ELISA dans le sérum n'a pas pu être réalisé. Les tests DOT, IFI dans le sérum et LCS, et ELISA dans le LCS sont négatifs,
- Témoin – SEP3 : positif en ELISA dans le LCS à 23,3 UI/mL sans autre résultat positif associé,
- Témoin – SEP4 : faiblement positif dans le sérum en DOT et en RIA à 1,7 UI/mL,
- Témoin - NI1 : faiblement positif en RIA dans le sérum à 0,8UI/mL.

Aucun de ces 5 témoins ne présentaient de DT1 associé.

L'ensemble des résultats de sensibilité et de spécificité sont représentés dans la Figure 20.

Matrice	DOT		ELISA		IFI		RIA	
	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Sérum	94	98	96	98	93	100	86	92
LCS	93	100	100	98	99	100	88	98

Figure 20 : Description des valeurs de performance des techniques utilisées pour la détection des GADA, établies à partir d'une cohorte de 293 patients SNAGAD nationale et d'une population de 49 témoins.

En dehors du RIA, le DOT, l'ELISA et l'IFI ont des valeurs performance supérieures à 90% tant dans le LCS que le sérum. L'IFI est la technique la plus performante dans le LCS, avec des sensibilités et spécificités proches de 100%. La spécificité est meilleure dans le LCS que dans le sérum pour toutes les méthodes.

4 Description du suivi clinico-biologique de la population SNAGAD Lilloise

La base de données Lilloise s'étend d'octobre 2006 à juin 2024, et compte 23 patients.

La majorité des patients, soit 87% (n=20), ont été traités par IgG IV sur une durée médiane de 4,5 mois [2,8 ; 63,5]. Parmi eux, 55% (n =11) ont également bénéficié de corticoïdes. Le traitement par corticoïdes a été initié par bolus de 1g pour 54.5% d'entre eux (n = 6), 18.2% (n = 2) par corticoïdes per os, et 27.3% (n = 3) ont reçu des bolus suivis de corticoïdes per os. En plus des corticoïdes, d'autres traitements immunosuppresseurs ont été administrés seuls ou en association. Parmi les patients traités par IgG IV, plus de la moitié (55%, n=11) ont reçu un ou plusieurs traitements immunosuppresseurs :

- Rituximab : 6 patients avec une moyenne de 3 cures (+/- 2.1). On retrouve respectivement 2 patients atteints d'une cérébellite ou d'une épilepsie auto-immune seule, 1 patient avec un syndrome de chevauchement « cérébellite-épilepsie » et 1 patient atteint d'un SPR,
- Cyclophosphamide : 4 patients avec une médiane de traitement de 8,5 mois [4 ; 12]. Il a principalement été proposé pour les patients atteints d'une cérébellite,

- Immunosuppresseurs per os : 5 patients, dont 3 patients traités par Mycophénolate Mofétil (MMF), 1 patient par Azathioprine et 1 par Méthotrexate. Aucune spécificité clinique notable ne ressort pour ces patients.

On dénombre 20 patients suivis cliniquement sur une médiane de 60,5 mois [22 ; 80], soit 5 ans avec les résultats suivants :

- Guérison : 2 patients (10%), l'un avait une EL et l'autre un SPR,
- Amélioration partielle : 10 patients (50%). Ce groupe inclut 20% (n = 2) de SPR, 20% (n = 2) de cérébellite, 20 % (n = 2) d'épilepsie auto-immune et 40 % (n = 4) de syndrome de chevauchement,
- Stabilisation : 6 patients (30%). Ils présentaient tous un syndrome de chevauchement associant une cérébellite et une épilepsie auto-immune pour 66.7% (n = 4) d'entre eux, ou une cérébellite et un SPR pour les 2 autres,
- Dégradation : 2 patients (10%) et tous avaient une cérébellite,
- Décès : Aucun.

Au cours du suivi, 13 patients ont bénéficié d'au moins un deuxième dosage de GADA dont 13 dans le sérum et 7 dans le LCS. Le délai médian entre le premier et le dernier dosage était de 39 mois [5 ; 74] dans le sérum et de 57 mois [41 ; 74] dans le LCS.

La majorité des patients (12/13 dans le sérum et 7/7 dans le LCS) avaient encore au moins un dosage des GADA positif lors du suivi, quel que soit le test, la durée de suivi ou le traitement. Un seul patient est passé d'un résultat dans le sérum faiblement positif en RIA à 1,3 UI/mL à négatif.

Si l'on considère chacune des techniques et des matrices lorsqu'elles sont réalisées au diagnostic et au suivi, on observait que :

- En CBA, un seul patient a bénéficié d'un dosage initial négatif, qui est resté négatif lors du suivi à 6 mois,
- En DOT, 42.9% des patients (3/7 patients) contrôlés dans le sérum et 50% (1/2 patients) dans le LCS avaient un résultat qui devient négatif,
- En ELISA, 60 % des patients (3/5 patients) dans le sérum et 100% dans le LCS (1/1 patient) restaient positifs avec un titre supérieur au seuil maximal de détection (20 000 UI/mL après dilution au 1/10^{ème}). Les concentrations sériques et du LCS de GADA ont diminué pour deux patients :
 - Patient 1 : Initialement supérieur à 20 000 UI/mL dans le sérum au diagnostic, puis à 2 245 UI/mL lors du suivi effectué à 37 mois. Le titre dans le LCS était à 45.7 U/ml, sans possibilité de comparaison par rapport au diagnostic car non réalisé. Ce patient, présentant une épilepsie auto-immune, a reçu 7 cures d'IgIV, des corticoïdes en bolus suivi d'un relais per os ; 2 cures de Rituximab et 12 cures d'Endoxan. Lors de la dernière évaluation clinique, il est constaté une amélioration partielle de ses crises.
 - Patient 2 : supérieur à 20 000 UI/mL au diagnostic puis 14 777 UI/mL lors du suivi effectué à 6 mois. Ce patient, atteint d'EL, a été traité par corticoïdes en bolus avec relai per os, échanges plasmatiques, et 2 cures d'IgG IV. A la dernière évaluation clinique, le patient présentait une amélioration clinique partielle.
- En IFI, 75% des patients gardaient un marquage anti-GAD typique dans le sérum (6/8 patients) et 50% dans le LCS (1/2 patients),

- En RIA, 89% des patients (8/9 patients) restaient positifs dans le sérum au suivi avec des titres plus faibles qu'au diagnostic. La médiane au diagnostic était de 87,6UI/mL [80,3 ; 133,5] avec 2 valeurs atteignant le seuil maximal de 300UI/mL et celle au suivi est de 79,6UI/mL [77 ; 94]. Tous les patients ayant bénéficié d'un RIA dans le LCS au cours du suivi (3/3 patients) sont restés positifs, avec un titre également plus faible qu'au diagnostic. Au diagnostic, la médiane était de 121,27 UI/mL [104 ; 138,5] avec une valeur atteignant le seuil de détection de 250 UI/mL ; et la médiane au suivi était de 77,2 UI/mL [38,6 ; 74,9], ne comprenant aucune valeur au-delà du seuil.

Ainsi, l'ensemble de nos patients GAD suivis au moins 3 mois a été traité par IgG IV seul ou associées à un ou plusieurs traitements immunosuppresseurs. La majorité des tests réalisés lors du suivi restent positifs peu importe la matrice utilisée, avec des concentrations de GADA qui semblent diminuer pour certains.

Discussion

Cette étude rétrospective multicentrique a permis d'identifier 293 patients présentant un tableau clinique de SNAGAD et ayant bénéficié d'un dosage de GADA entre 1998 et 2023. Il s'agit de la plus grande cohorte rapportée dans la littérature [2,39]. La majorité des patients (61.4%) avaient bénéficié d'un dosage couplé dans le sérum et le LCS et 21.2% uniquement un dosage sérique. Ce travail collaboratif nous a permis d'observer (i) une augmentation du nombre de dosages mais aussi de la diversité des tests réalisés quelle que soit la matrice ; (ii) que dans le sérum, les méthodes les plus fréquemment utilisées sont le DOT et l'IFI, réalisés chez plus de la moitié des patients (57% et 53,2% des patients) ; (iii) que dans le LCS, c'est l'IFI qui est la plus fréquemment réalisée (68,9% des patients), suivie du CBA et du DOT ; (iv) que quelle que soit la matrice, les concordances inter-test et inter-matrice de l'IFI, le DOT, l'ELISA et le CBA pour la détection des GADA, sont excellentes, à plus de 90%, sauf entre le CBA et le DOT dans le LCS qui retrouvent des résultats discordants dans 12,8% des cas ; (v) d'excellentes valeurs de performance pour chacune de ces techniques.

La principale force de cette étude repose sur son approche multicentrique, qui a permis de recueillir des données représentatives du diagnostic des SNAGAD au niveau national. La période analysée est par ailleurs particulièrement longue (environ 26 ans). Cela nous a permis d'observer l'évolution de nos pratiques biologiques, mais également d'analyser un sous-groupe de patients ayant bénéficié d'un contrôle de GADA au cours du suivi. Enfin, le fait d'avoir récupéré les dosages de GADA réalisés dans les centres dont étaient issus les patients, a permis d'analyser plusieurs résultats

par patient et donc d'estimer les concordances et reproductibilités de chaque technique, et d'obtenir un nombre de données suffisant pour en évaluer les performances.

La principale limite de cette étude est son caractère rétrospectif qui l'expose à un biais de mémoire et de données manquantes, notamment pour certaines données biologiques, telles que les marques des kits ou les concentrations exactes de GADA. Un autre biais important est lié à l'absence de distinction entre les kits utilisés pour les tests. Bien que les techniques soient similaires dans leur principe, les variations industrielles entre kits n'ont jamais été rigoureusement évaluées. Cela complique l'interprétation uniforme des données collectées.

La cohorte nationale de 293 patients SNAGAD est conforme à la littérature pour la prédominance féminine (77.1 %) et l'âge moyen de début à 51,2 ans (+/- 16,6) [39]. Les tableaux cliniques diffèrent néanmoins, puisqu'ils présentent majoritairement dans notre observation, une encéphalite limbique (39.9 %), alors que les études rapportent d'abord des phénotypes de SPR ou de cérébellite. Cette divergence pourrait s'expliquer par un biais de sélection. Etant donné que nos données proviennent du CRMR de Lyon, il est possible que les centres n'aient sollicité un avis que pour certains patients avec tableau clinique sévère, ce qui est souvent le cas des EL, contrairement au SPR dont le diagnostic et la prise en charge, sans être consensuelles répondent à des habitudes plus anciennes [7,8,40]. Cette idée est confortée par l'analyse de la répartition des tableaux cliniques des patients suivis au CHU de Lille qui semble plus proche de la littérature. La cohorte nationale n'est donc possiblement pas exhaustive malgré le nombre de patients tracés.

L'association entre un cancer et un SNAGAD est rare, avec une prévalence d'environ 15 % dans la littérature, ce que confirme notre étude avec 12,3 % de cas de SNAGAD paranéoplasiques. Ces cas sont souvent associés à un tableau clinique de SPR ou de cérébellite et à un cancer du sein [6,43,47,90].

Plus de la moitié des patients atteints de SNAGAD et suivis à Lille présentent une pathologie auto-immune associée, ce qui est également comparable aux données de la littérature, et notamment aux données de la série de la *Mayo Clinic* (59% sur 212 patients SNAGAD) [39]. Le DT1 touche 17.4% des patients lillois, un chiffre inférieur aux 30% fréquemment rapportés. Cependant, la comparaison de ces résultats est difficile en raison du faible effectif sur Lille ($n=23$) inclus dans cette analyse [3,6,35,37,39,47]. Pour ce qui est des thyroïdites auto-immunes, leur prévalence (34,8 %) est cohérente avec les données publiées [35,36,39], bien que certaines séries rapportent des prévalences allant jusqu'à 60 % [17].

Une analyse conjointe dans le sérum et le LCS concerne 61.4 % des patients, tandis que 21.2 % n'ont eu un dosage que dans le sérum. Bien que la détection de GADA dans le LCS ne soit pas systématiquement nécessaire pour poser le diagnostic de SNAGAD, elle peut apporter des informations complémentaires pertinentes, notamment en cas de DT1 associée. En effet, seuls les patients présentant un SNAGAD auront des GADA détectés dans leur LCS [26,36,91,92], ce qui permet de s'assurer d'une auto-immunité neurologique. Il est donc recommandé de réaliser leur recherche dans les deux matrices afin d'optimiser le diagnostic. Ce point fait également consensus chez la majorité des auteurs [8,26,36,40].

Moins de 10% des dosages ont été réalisés entre 1998 et 2013 et plus de 60% des dosages analysés pour ce travail ont été réalisés entre 2019 et 2023. Cette faible proportion de tests entre 1998 et 2013 s'explique en partie par des données manquantes dues à des changements des logiciels de stockage de données des hôpitaux et laboratoires, qui ne couvrent pas les périodes les plus anciennes. Après 2013, l'amélioration des connaissances scientifiques et la plus grande accessibilité en routine des techniques biologiques au fur et à mesure des années, a contribué à augmenter le nombre de dosages des GADA. Par ailleurs dès 2004, la création des filières maladies rares a permis progressivement de structurer les soins et de sensibiliser les professionnels à ces pathologies. Le second plan national maladies rares de 2014 a renforcé cette tendance en favorisant la centralisation des données et les consultations auprès des CRMR. En parallèle, les critères diagnostiques d'encéphalite auto-immune de Graus 2016 et de syndromes neurologiques paranéoplasiques en 2021 [49,90], ont également contribué à une meilleure reconnaissance de ces pathologies. Enfin, le lancement du kit Euroimmun® DOT en 2015 a facilité l'accès aux tests de dépistage dans les centres régionaux, contribuant à la hausse du nombre de dosages réalisés [89]. Aussi, les progrès médico-scientifiques portés par la description clinico-biologique des encéphalites autoimmunes et paranéoplasiques [49,90] ont accompagné l'évolution des dosages de GADA dans le temps aussi bien en nombre qu'en techniques.

L'IFI est la technique la plus couramment observée dans notre cohorte, à la fois dans le sérum et dans le LCS. L'IFI montre une concordance positive de plus de 90% avec d'autres techniques comme le DOT et l'ELISA et présente les valeurs de concordances les plus élevées avec les autres techniques dans le LCS. C'est la technique la plus

reproduite (respectivement 28 et 24 fois dans le sérum et le LCS). Cela s'explique très probablement par le fait qu'une première IFI est souvent réalisée au centre préleveur puis une seconde au CRMR de Lyon. Ses résultats sont reproductibles dans plus de 90% des cas dans le sérum et dans 70,8% des cas dans le LCS, malgré le fait que l'IFI soit une technique opérateur-dépendante. Cela suggère que les résultats obtenus restent souvent cohérents entre le centre préleveur et le CRMR. Cependant, selon le kit, l'IFI dépend de la disponibilité de cervelets de singe, limitant son accessibilité et soulevant un enjeu éthique. Toutefois, cette méthode, ancienne, a l'avantage d'être la plus économique (par exemple : 308,38 € pour 50 tests avec le kit IFI Werfen®).

Le DOT est la deuxième technique la plus employée dans notre cohorte et présente une forte concordance (> 90% quelle que soit la matrice), sauf entre le DOT et le CBA qui sont discordants dans 12,8% des cas dans le LCS. Cette différence pourrait s'expliquer par les spécificités techniques de chaque méthode : le DOT détecte principalement des épitopes linéaires, tandis que le CBA cible les épitopes conformationnels, tous deux possiblement présents chez un même patient. Le DOT est le plus souvent réalisé en dépistage initiale puis confirmé par une autre méthode, souvent par l'IFI, comme cela est déjà décrit pour les autres anticorps anti-neuronaux [89]. Ces deux techniques sont avantageuses car elles permettent de détecter un large éventail d'anticorps anti-antigènes intracellulaires, un critère important dans le diagnostic de des syndromes neurologiques associés aux anticorps anti-neuronaux où plusieurs anticorps peuvent être envisagés simultanément. Il présente l'avantage d'être rapide, automatisé mais peu économique (475,20€ pour 16 tests avec le kit Euroimmun®). Un dernier aspect qui mérite attention est l'inclusion des dosages des GAD67-A, qui ne sont mesurés que par certains tests DOT. Bien que leur intérêt

clinique n'ait pas encore été étudié, ils constituent une piste de recherche intéressante en tant que marqueur diagnostique, pronostique ou de suivi chez les patients SNAGAD.

L'ELISA, validé pour la détection des GAD65-A dans le DT1 [73], est la troisième technique la plus utilisée dans notre population, quelle que soit la matrice. C'est une méthode largement accessible pour de nombreux laboratoires par sa rapidité et facilité d'utilisation. Il existe des variations de coûts en fonction des kits spécifiques utilisés. L'ELISA, comme le RIA, permet un dosage quantitatif des GADA. Dans notre étude, l'ELISA retrouve dans la très grande majorité des cas (91% dans le sérum et 89,5% dans le LCS) des titres bien supérieurs au seuil maximal de détection, limitant l'intérêt de cette approche quantitative et l'exposant à un risque d'effet crochet voire de faux négatifs. Ces résultats sont cohérents avec la littérature où il est bien établi que les titres de GADA sont plus élevés chez les patients atteints de SNAGAD que chez ceux ayant un DT1 [14,32,39,63,93]. Avec des concentrations plus modérées et plus souvent dans les bornes de détection, le LCS semble être la matrice la plus adaptée pour l'analyse quantitative des GADA dans les SNAGAD [80].

La proportion d'ELISA et de DOT est restée globalement stable dans le temps, tandis que celle de l'IFI a diminué au profit de l'apparition du CBA.

Le CBA, utilisé uniquement dans des centres spécialisés comme le CRMR de Lyon, connaît une utilisation croissante, bien que son usage reste limité à ces laboratoires experts. Il ne convient donc pas facilement à une utilisation de routine, et pourrait plutôt être réservée aux situations complexes ou de discordances entre différentes techniques.

La recherche des GADA en RIA est minoritaire dans la cohorte nationale (7.2% dans le sérum et 2.8% dans le LCS), et surtout réalisée au CHU de Lille (80.9% des RIA nationaux). Le titre obtenu avec cette méthode est le plus souvent dans les bornes de détection (71,4% dans le sérum et 85,7% dans le LCS). Les performances du RIA restent intéressantes, mais moindres que celles observées pour les autres techniques notamment avec des valeurs de sensibilité plus faible (86 % dans le sérum et 88 % dans le LCS). Cette différence, par rapport aux autres techniques, pourrait être liée à un effectif restreint de patients ayant bénéficié d'un dosage par RIA, introduisant un biais de sous-échantillonnage. Bien que peu utilisé dans notre cohorte, il est toutefois largement décrit pour le diagnostic des SNAGAD dans la littérature [32,36,39,47]. Malgré son assez faible coût (par exemple, le kit RIA de Medipan® coûte 330,72€ pour 40 dosages), sa faible utilisation en routine peut s'expliquer par les contraintes liées à l'usage de radio-isotopes, qui le réserve aux laboratoires spécialisés. Bien qu'elle permette de détecter un plus grand nombre de patients avec des titres dans les bornes de détection des kits, et donc d'avoir un résultat quantitatif chiffré potentiellement utile pour le suivi, les contraintes techniques limitent son utilisation en routine.

L'ensemble de ces techniques de dosage confirment la détection de GADA, avec des résultats positifs entre 85,7% et 99% quelle que soit la technique ou la matrice. Dans notre cohorte, l'IFI et le DOT sont les techniques majoritairement employées peu importe la matrice, alors que dans la littérature c'est l'ELISA qui est la plus utilisée.

La majorité de nos patients a bénéficié de plusieurs techniques de dosages, et leurs résultats, notamment en CBA, DOT, IFI et ELISA, concordent dans la grande majorité des cas (> 90% quelle que soit la matrice). Une excellente concordance des résultats

en CBA, DOT, IFI et l'ELISA existe aussi entre le sérum et le LCS. Cela confirme les données existantes dans la littérature qui suggèrent que le dosage dans le LCS ne serait pas toujours nécessaire au diagnostic de SNAGAD [9,10,39]. Toutefois, 11 patients présentent tout de même des résultats positifs seulement dans le LCS et négatifs dans le sérum. Cela peut s'expliquer, pour les dosages quantitatifs, par le risque de faux négatif secondaire à l'effet crochet en l'absence de toutes dilutions

Pour le DOT, l'ELISA et l'IFI, les valeurs de sensibilité et spécificité sont excellentes et comprises entre 93 et 100 %, tant dans le LCS que dans le sérum. Pour le CLIA, nous ne disposons pas de données suffisantes dans notre cohorte pour établir des valeurs de sensibilité et de spécificité. Néanmoins, cette technique a été validée, dans la littérature, à la fois dans le sérum et le LCS dans la détection de GADA chez les patients SNAGAD [78,80]. Son faible coût (384.38 € pour 50 dosages) et son automatisation complète le rendent intéressant. Il faut garder à l'esprit qu'il existe une grande diversité de kits utilisés et une grande variabilité des modalités de réalisation

Sur les 23 patients suivis au CHU de Lille avec des dosages séquentiels, la majorité ont été traités par IgG IV (87%) avec une médiane de 44,5 mois [2,8 ; 63,5]. Cette durée témoigne d'une grande variabilité dans les traitements, reflétant l'hétérogénéité des prises en charge. Nos données sont en grande partie conformes avec les pratiques décrites dans la littérature [46,47,51,60,94,95] à l'exception de l'utilisation plus fréquente des immunosuppresseurs dans notre cohorte (55%). En comparaison, Muñoz-Lopetegi *et al.*, rapportent moins de la moitié de leurs patients sous immunosuppresseurs [10]. Cette différence pourrait s'expliquer par une plus grande proportion de patients atteints de cérébellite dans la cohorte lilloise (17 patients contre

3 dans l'étude citée), traduisant une sévérité clinique plus importante justifiant l'usage accru d'immunosuppresseurs.

La très grande majorité des patients (92,3% dans le sérum et 100% dans le LCS) garde des GADA détectables au cours du suivi, et ce même après une longue médiane de suivi. Toutefois, pour les patients ayant bénéficié d'un dosage quantitatif au diagnostic et au suivi, une diminution des concentrations a été observée chez 40% d'entre eux. Il reste, cependant, à démontrer si cette réduction est corrélée à une amélioration clinique et si cela peut être extrapolé compte tenu d'un très faible effectif analysé. Dans une étude antérieure comparant 2 groupes de patients, l'un avec des concentrations élevées de GADA ($> 10\,000$ UI/mL en ELISA) et l'autre avec des concentrations faibles, aucune différence significative dans la réponse aux traitements n'a été retrouvée entre les 2 groupes [10]. De plus, une étude portant sur six patients SNAGAD suivis pendant un an, a révélé des titres de GADA stables, malgré une prise en charge thérapeutique [32]. Ainsi, bien que ces études ne montrent pas de lien direct entre la variation des taux de GADA et la réponse thérapeutique, elles ne réfutent pas non plus cette hypothèse. Nos données ainsi que celles de la littérature sont insuffisantes pour statuer sur l'intérêt de suivre l'évolution du titre d'anticorps. Des études complémentaires seraient nécessaires pour clarifier le rôle des titres de GADA dans le suivi thérapeutique des patients SNAGAD.

En l'absence de consensus établi, l'approche diagnostique, l'approche diagnostique actuelle décrite dans la littérature consiste à combiner plusieurs techniques comme : RIA et le DOT [8], l'ELISA, l'immunohistochimie et le CBA [10] ; ou l'ELISA, le DOT et le CBA par exemple [2]. Grâce à ces nouveaux résultats, les perspectives de notre travail sont celles de l'élaboration de recommandations dans l'approche diagnostique des SNAGAD.

Conclusion

Les SNAGAD constituent une entité clinique complexe par la diversité des phénotypes clinique, mais également par les modalités techniques disponibles pour la mise en évidence de GADA. Bien que globalement concordantes, ces techniques présentent des spécificités et contraintes distinctes.

Cette thèse a permis d'effectuer un état des lieux des méthodes utilisées pour détecter les GADA dans le cadre du SNAGAD. Actuellement, les techniques principalement utilisées sont l'IFI et le DOT, suivi de l'ELISA puis du CBA. Les concentrations de GADA sont élevées, particulièrement dans le sérum avec des titres dépassant les bornes de détection des kits motivant des dilutions itératives pour déterminer les concentrations précises. La recherche de GADA dans le LCS reste pertinente surtout pour s'affranchir d'un faux positif sérique chez un patient DT1 et du risque d'effet moins important.

Pour améliorer la prise en charge des patients nous proposons de standardiser les techniques de dosage utilisées pour le diagnostic et le suivi des patients SNAGAD en France. Étant donné la bonne concordance entre les différentes techniques, toutes pourraient être incluses dans ces recommandations diagnostiques. En pratique, le DOT, simple, économique, disponible et plutôt à risque de faux positif, pourrait être utilisé en première intention à la fois dans le sérum et le LCS en dépistage, suivi d'une confirmation par IFI, associée à un dosage quantitatif en ELISA dans le LCS. Le CBA, réservé aux centres experts, serait complémentaire dans les cas complexes ou discordants.

Liste des tables

Table 1: Tableau descriptif de la cohorte nationale et Lilloise	59
Table 2 : Description des techniques de dosage réalisées par patient au diagnostic dans la cohorte nationale et Lilloise	63

Liste des Figures

Figure 1: Illustration du rôle de la GAD65 au sein de la transmission synaptique, créée dans BioRender.com.	9
Figure 2 : Inhibition réciproque et génération de raideur chez les patients atteints du syndrome de la personne raide. Adapté de Tsiortou <i>et al.</i> , 2021 [9].....	13
Figure 3 : Principes du dosage en RIA compétitif, à partir de Cerda-Kipper <i>et al.</i> , 2019 [66].....	24
Figure 4: Schéma illustrant l'effet prozone avec un test immunologique de type « sandwich », à partir de Tritos <i>et al.</i> , 2019 [70].	26
Figure 5: Schéma de l'ELISA indirect, à partir de Kuby Immunology, p 149 [67].....	28
Figure 6 : Schéma de l'ELISA bridge.....	29
Figure 7: Schéma du principe de CLIA direct, à partir de Muddasir Khan <i>et al.</i> , 2023, [77].....	32
Figure 8: Schéma de l'IFI avec anticorps secondaires marqués par un fluorochrome, à partir de Joshi et Yu, 2013 [81]	35
Figure 9 : Image d'IFI représentant un marquage péri-nucléaire de la couche granulaire typique de GADA-65 , à partir du colloque de 2018 du Groupe d'Etude de l'Auto Immunité [84]	36
Figure 10 : Schéma de CBA pour la détection de GADA par IFI, adapté de Guerra <i>et al.</i> , 2014 [86].....	38
Figure 11 : Illustration d'un immunoDOT, adapté à partir du site internet Euroimmun® [88].....	39
Figure 12 : Flow chart représentant les 3 bases de données permettant de définir notre population d'étude nationale.	56
Figure 13 : Description des tableaux cliniques avec représentation des syndromes de chevauchement, au sein de la cohorte nationale de 293 patients	57
Figure 14 : Description des tableaux cliniques avec représentation des syndromes de chevauchement, au sein de la cohorte lilloise de 23 patients.	60
Figure 15A: Histogramme des dosages réalisés dans le sérum au sein de la cohorte nationale de 293 patients.....	64
Figure 15B: Histogramme des dosages réalisés dans le LCS au sein de la cohorte nationale.	65
Figure 16A: Histogramme du nombre des tests dans le sérum entre 1998 et 2023.	69
Figure 16B : Histogramme de répartition des techniques de dosage réalisées dans le sérum entre 1998 et 2023, sous forme de pourcentage sur le total de tests sur la période.	70
Figure 17A : Histogramme de répartition des tests dans le LCS entre 1998 et 2023.	71

Figure 17B : Histogramme de répartition des techniques de dosage réalisées dans le LCS entre 1998 et 2023, sous forme de pourcentage sur le total de tests sur la période.	72
Figure 18A : Description des résultats du dosage des GADA entre différentes techniques dans le sérum.....	75
Figure 18B : Description des résultats du dosage des GADA entre différentes techniques dans le LCS.	76
Figure 19 : Description des résultats du dosage des GADA par une même technique entre différentes matrices (sérum vs LCS)	77
Figure 20 : Description des valeurs de performance des techniques utilisées pour la détection des GADA, établies à partir d'une cohorte de 293 patients SNAGAD nationale et d'une population de 49 témoins.	80

Références

- [1] Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 1991;7:91–100. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90077-D](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90077-D).
- [2] Dade M, Berzero G, Izquierdo C, Giry M, Benazra M, Delattre J-Y, et al. Neurological Syndromes Associated with Anti-GAD Antibodies. *Int J Mol Sci* 2020;21:3701. <https://doi.org/10.3390/ijms21103701>.
- [3] McKeon A, Tracy JA. GAD65 neurological autoimmunity. *Muscle Nerve* 2017;56:15–27. <https://doi.org/10.1002/mus.25565>.
- [4] Petroff OAC. Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. *The Neuroscientist* 2002;8:562–73. <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>.
- [5] Fenalti G, Buckle AM. Structural biology of the GAD autoantigen. *Autoimmun Rev* 2010;9:148–52. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.05.003>.
- [6] Dalakas MC. Stiff-person Syndrome and GAD Antibody-spectrum Disorders: GABAergic Neuronal Excitability, Immunopathogenesis and Update on Antibody Therapies. *Neurotherapeutics* 2022;19:832–47. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01188-w>.
- [7] Alexopoulos H, Dalakas MC. Immunology of stiff person syndrome and other GAD-associated neurological disorders. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9:1043–53. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2013.845527>.
- [8] Graus F, Saiz A, Dalmau J. GAD antibodies in neurological disorders - insights and challenges. *Nat Rev Neurol* 2020;16:353–65. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0359-x>.
- [9] Tsiortou P, Alexopoulos H, Dalakas MC. GAD antibody-spectrum disorders: progress in clinical phenotypes, immunopathogenesis and therapeutic interventions. *Ther Adv Neurol Disord* 2021;14:17562864211003486. <https://doi.org/10.1177/17562864211003486>.
- [10] Muñoz-Lopetegi A, de Bruijn MAAM, Boukhrissi S, Bastiaansen AEM, Nagtzaam MMP, Hulsboom ESP, et al. Neurologic syndromes related to anti-GAD65. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2020;7:e696. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000696>.
- [11] Autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase in a Patient with Stiff-Man Syndrome, Epilepsy, and Type I Diabetes Mellitus | *NEJM* n.d. https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM198804213181602?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed (accessed May 18, 2023).
- [12] Piquer S, Belloni C, Lampasona V, Bazzigaluppi E, Vianello M, Giometto B, et al. Humoral autoimmune responses to glutamic acid decarboxylase have similar target epitopes and subclass that show titer-dependent disease association. *Clin Immunol Orlando Fla* 2005;117:31–5. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.06.009>.

- [13] Lohmann T, Hawa M, Leslie RDG, Lane R, Picard J, Londei M. Immune reactivity to glutamic acid decarboxylase 65 in stiff-man syndrome and type 1 diabetes mellitus. *The Lancet* 2000;356:31–5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02431-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02431-4).
- [14] Kim J, Namchuk M, Bugawan T, Fu Q, Jaffe M, Shi Y, et al. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH2-terminal epitope in the autoantigen GAD65, distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1994;180:595–606. <https://doi.org/10.1084/jem.180.2.595>.
- [15] Burbelo PD, Groot S, Dalakas MC, Iadarola MJ. High definition profiling of autoantibodies to glutamic acid decarboxylases GAD65/GAD67 in stiff-person syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.077>.
- [16] Fouka P, Alexopoulos H, Akrivou S, Trohatou O, Politis PK, Dalakas MC. GAD65 epitope mapping and search for novel autoantibodies in GAD-associated neurological disorders. *J Neuroimmunol* 2015;281:73–7. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.03.009>.
- [17] Gresa-Arribas N, Ariño H, Martínez-Hernández E, Petit-Pedrol M, Sabater L, Saiz A, et al. Antibodies to Inhibitory Synaptic Proteins in Neurological Syndromes Associated with Glutamic Acid Decarboxylase Autoimmunity. *PLoS ONE* 2015;10:e0121364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121364>.
- [18] Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, et al. Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. 1993. <https://doi.org/10.1172/JCI116714>.
- [19] Jayakrishnan B, Hoke DE, Langendorf CG, Buckle AM, Rowley MJ. An Analysis of the Cross-Reactivity of Autoantibodies to GAD65 and GAD67 in Diabetes. *PLoS ONE* 2011;6:e18411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018411>.
- [20] Daw K, Ujihara N, Atkinson M, Powers AC. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition. *J Immunol Baltim Md* 1950 1996;156:818–25.
- [21] Solimena M, Butler MH, De Camilli P. GAD, diabetes, and Stiff-Man syndrome: some progress and more questions. *J Endocrinol Invest* 1994;17:509–20. <https://doi.org/10.1007/BF03347745>.
- [22] Zilioli A, Misirocchi F, Pancaldi B, Mannini E, Mutti C, Zinno L, et al. Anti-Gad 65 encephalitis with rapidly progressive temporal atrophy reveals the involvement of the temporal lobe in the neuroanatomical basis of palilalia. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav* 2023;160:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2022.12.010>.
- [23] Daif A, Lukas RV, Issa NP, Javed A, VanHaerents S, Reder AT, et al. Antiglutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) antibody-associated epilepsy. *Epilepsy Behav EB* 2018;80:331–6. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.01.021>.
- [24] Baizabal-Carvallo JF, Alonso-Juarez M. Cerebellar disease associated with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies: review. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996 2017;124:1171–82. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1754-3>.

- [25] Müller I, Çalışkan G, Stork O. The GAD65 knock out mouse – a model for GABAergic processes in fear- and stress-induced psychopathology. *Genes Brain Behav* 2015;14:37–45. <https://doi.org/10.1111/gbb.12188>.
- [26] Dalakas MC, Li M, Fujii M, Jacobowitz DM. Stiff person syndrome: Quantification, specificity, and intrathecal synthesis of GAD65 antibodies. *Neurology* 2001;57:780–4. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.5.780>.
- [27] Levy LM, Levy-Reis I, Fujii M, Dalakas MC. Brain γ -Aminobutyric Acid Changes in Stiff-Person Syndrome. *Arch Neurol* 2005;62:970–4. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.6.970>.
- [28] Molloy FM, Dalakas MC, Floeter MK. Increased brainstem excitability in stiff-person syndrome. *Neurology* 2002;59:449–51. <https://doi.org/10.1212/WNL.59.3.449>.
- [29] Valinčiūtė J, Jucevičiūtė N, Balnytė R, Jurkevičienė G, Gelžinienė G. GAD65 Antibody-Associated Epilepsy. *Med Kaunas Lith* 2023;59:1135. <https://doi.org/10.3390/medicina59061135>.
- [30] Dillon CF, Weisman MH, Miller FW. Population-based estimates of humoral autoimmunity from the U.S. National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960–2014. *PLoS ONE* 2020;15:e0226516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226516>.
- [31] Walikonis JE, Lennon VA. Radioimmunoassay for glutamic acid decarboxylase (GAD65) autoantibodies as a diagnostic aid for stiff-man syndrome and a correlate of susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1998;73:1161–6. <https://doi.org/10.4065/73.12.1161>.
- [32] Nakajima H, Nakamura Y, Inaba Y, Tsutsumi C, Unoda K, Hosokawa T, et al. Neurologic disorders associated with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies: A comparison of anti-GAD antibody titers and time-dependent changes between neurologic disease and type I diabetes mellitus. *J Neuroimmunol* 2018;317:84–9. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.01.007>.
- [33] Hampe CS, Petrosini L, De Bartolo P, Caporali P, Cutuli D, Laricchiuta D, et al. Monoclonal antibodies to 65kDa glutamate decarboxylase induce epitope specific effects on motor and cognitive functions in rats. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:82. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-82>.
- [34] Kwan P, Sills GJ, Kelly K, Butler E, Brodie MJ. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in controlled and uncontrolled epilepsy: a pilot study. *Epilepsy Res* 2000;42:191–5. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(00)00180-7).
- [35] Matsui N, Tanaka K, Ishida M, Yamamoto Y, Matsubara Y, Saika R, et al. Prevalence, Clinical Profiles, and Prognosis of Stiff-Person Syndrome in a Japanese Nationwide Survey. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2023;10:e200165. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200165>.
- [36] Saiz A, Blanco Y, Sabater L, González F, Bataller L, Casamitjana R, et al. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain J Neurol* 2008;131:2553–63. <https://doi.org/10.1093/brain/awn183>.
- [37] Dalakas MC, Fujii M, Li M, McElroy B. The clinical spectrum of anti-GAD antibody-positive patients with stiff-person syndrome. *Neurology* 2000;55:1531–5. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.10.1531>.

- [38] Matsumoto S, Kusahara T, Nakajima M, Ouma S, Takahashi M, Yamada T. Acute attacks and brain stem signs in a patient with glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:345–6. <https://doi.org/10.1136/jnnp.73.3.345>.
- [39] Budhram A, Sechi E, Flanagan EP, Dubey D, Zekeridou A, Shah SS, et al. Clinical spectrum of high-titre GAD65 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021;92:645–54. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-325275>.
- [40] Brown P, Marsden CD. The stiff man and stiff man plus syndromes. *J Neurol* 1999;246:648–52. <https://doi.org/10.1007/s004150050425>.
- [41] Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2010;67:470–8. <https://doi.org/10.1002/ana.21917>.
- [42] Saiz A, Arpa J, Sagasta A, Casamitjana R, Zarranz JJ, Tolosa E, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 1997;49:1026–30. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.4.1026>.
- [43] Ariño H, Höftberger R, Gresa-Arribas N, Martínez-Hernández E, Armangue T, Kruer MC, et al. Paraneoplastic Neurological Syndromes and Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies. *JAMA Neurol* 2015;72:874–81. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0749>.
- [44] Folli Franco, Solimena Michele, Cofield Roxanne, Austoni Mario, Tallini Giovanni, Fasseta Giuliano, et al. Autoantibodies to a 128-kd Synaptic Protein in Three Women with the Stiff-Man Syndrome and Breast Cancer. *N Engl J Med* 1993;328:546–51. <https://doi.org/10.1056/NEJM199302253280805>.
- [45] Mh B, A H, N O, C V, Cm B, G F, et al. Autoimmunity to gephyrin in Stiff-Man syndrome. *Neuron* 2000;26. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81165-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81165-4).
- [46] Dalakas MC, Fujii M, Li M, Lutfi B, Kyhos J, McElroy B. High-dose intravenous immune globulin for stiff-person syndrome. *N Engl J Med* 2001;345:1870–6. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa01167>.
- [47] McKeon A, Robinson MT, McEvoy KM, Matsumoto JY, Lennon VA, Ahlskog JE, et al. Stiff-man syndrome and variants: clinical course, treatments, and outcomes. *Arch Neurol* 2012;69:230–8. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.991>.
- [48] Li T-R, Zhang Y-D, Wang Q, Shao X-Q, Li Z-M, Lv R-J. Intravenous methylprednisolone or immunoglobulin for anti-glutamic acid decarboxylase 65 antibody autoimmune encephalitis: which is better? *BMC Neurosci* 2020;21:13. <https://doi.org/10.1186/s12868-020-00561-9>.
- [49] Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol* 2016;15:391–404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00401-9).
- [50] Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic Neurons and Pancreatic Beta Cells in Stiff-Man Syndrome. *N Engl J Med* 1990;322:1555–60. <https://doi.org/10.1056/NEJM199005313222202>.

- [51] Vlad B, Wang Y, Newsome SD, Balint B. Stiff Person Spectrum Disorders—An Update and Outlook on Clinical, Pathophysiological and Treatment Perspectives. *Biomedicines* 2023;11:2500. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11092500>.
- [52] Yarlagadda A, Helvink B, Chou C, Clayton AH. Blood Brain Barrier. *Psychiatry Edgmont* 2007;4:57–9.
- [53] Barker RA, Revesz T, Thom M, Marsden CD, Brown P. Review of 23 patients affected by the stiff man syndrome: clinical subdivision into stiff trunk (man) syndrome, stiff limb syndrome, and progressive encephalomyelitis with rigidity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:633–40. <https://doi.org/10.1136/jnnp.65.5.633>.
- [54] Successful treatment of Stiff Person Syndrome with botulinum toxin. MDS Abstr n.d. <https://www.mdsabstracts.org/abstract/successful-treatment-of-stiff-person-syndrome-with-botulinum-toxin/> (accessed September 15, 2024).
- [55] Honnorat J, Trouillas P, Thivolet C, Aguera M, Belin MF. Autoantibodies to glutamate decarboxylase in a patient with cerebellar cortical atrophy, peripheral neuropathy, and slow eye movements. *Arch Neurol* 1995;52:462–8. <https://doi.org/10.1001/archneur.1995.00540290050017>.
- [56] Hadjivassiliou M, Boscolo S, Tongiorgi E, Grünewald RA, Sharrack B, Sanders DS, et al. Cerebellar ataxia as a possible organ-specific autoimmune disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2008;23:1370–7. <https://doi.org/10.1002/mds.22129>.
- [57] Nanri K, Okuma M, Sato S, Yoneda M, Taguchi T, Mitoma H, et al. Prevalence of Autoantibodies and the Efficacy of Immunotherapy for Autoimmune Cerebellar Ataxia. *Intern Med Tokyo Jpn* 2016;55:449–54. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.5156>.
- [58] Giometto B, Nicolao P, Macucci M, Tavalato B, Foxon R, Bottazzo GF. Temporal-lobe epilepsy associated with glutamic-acid-decarboxylase autoantibodies. *Lancet Lond Engl* 1998;352:457. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)79192-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)79192-3).
- [59] Peltola J, Kulmala P, Isojärvi J, Saiz A, Latvala K, Palmio J, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with therapy-resistant epilepsy. *Neurology* 2000;55:46–50. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.1.46>.
- [60] Malter MP, Frisch C, Zeitler H, Surges R, Urbach H, Helmstaedter C, et al. Treatment of immune-mediated temporal lobe epilepsy with GAD antibodies. *Seizure - Eur J Epilepsy* 2015;30:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.05.017>.
- [61] Mäkelä K-M, Hietaharju A, Brander A, Peltola J. Clinical Management of Epilepsy With Glutamic Acid Decarboxylase Antibody Positivity: The Interplay Between Immunotherapy and Anti-epileptic Drugs. *Front Neurol* 2018;9:579. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00579>.
- [62] Matà S, Muscas GC, Naldi I, Rosati E, Paladini S, Cruciatti B, et al. Non-paraneoplastic limbic encephalitis associated with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Neuroimmunol* 2008;199:155–9. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.05.015>.

- [63] Kono S, Miyajima H, Sugimoto M, Suzuki Y, Takahashi Y, Hishida A. Stiff-person Syndrome Associated with Cerebellar Ataxia and High Glutamic Acid Decarboxylase Antibody Titer. *Intern Med* 2001;40:968–71. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.40.968>.
- [64] Yoshimoto T, Doi M, Fukai N, Izumiyama H, Wago T, Minami I, et al. Type 1 diabetes mellitus and drug-resistant epilepsy: presence of high titer of anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid. *Intern Med Tokyo Jpn* 2005;44:1174–7. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.44.1174>.
- [65] Ricken G, Schwaiger C, De Simoni D, Pichler V, Lang J, Glatter S, et al. Detection Methods for Autoantibodies in Suspected Autoimmune Encephalitis. *Front Neurol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00841>.
- [66] Cerda-Kipper AS, Montiel BE, Hosseini S. Immunoassays | Radioimmunoassays and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay☆. In: Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M, editors. *Encycl. Anal. Sci.* Third Ed., Oxford: Academic Press; 2019, p. 55–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14510-X>.
- [67] Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Kuby Immunology*. W. H. Freeman; 2007.
- [68] Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto-Immun Highlights* 2017;8:9. <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2>.
- [69] Jacobs JFM, van der Molen RG, Bossuyt X, Damoiseaux J. Antigen excess in modern immunoassays: To anticipate on the unexpected. *Autoimmun Rev* 2015;14:160–7. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.10.018>.
- [70] Tritos NA, Klibanski A. Chapter 3 - Prolactin and Its Role in Human Reproduction. In: Strauss JF, Barbieri RL, editors. *Yen Jaffes Reprod. Endocrinol.* Eighth Ed., Philadelphia: Elsevier; 2019, p. 58-74.e8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00003-2>.
- [71] Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E. Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The Second International GADAB Workshop. *Diabetes* 1995;44:636–40. <https://doi.org/10.2337/diab.44.6.636>.
- [72] Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Høier-Madsen M, et al. Detection of GAD65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 1994;43:459–67. <https://doi.org/10.2337/diab.43.3.459>.
- [73] Wild T, Scherbaum WA, Giechmann H, Landt M, Scintiago J, Cavallo MC, et al. Comparison of a New Anti-glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with Radioimmunoassay Methods: A Multicenter Study n.d.
- [74] Brooking H, Ananieva-Jordanova R, Arnold C, Amoroso M, Powell M, Betterle C, et al. A sensitive non-isotopic assay for GAD65 autoantibodies. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2003;331:55–9. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00088-3](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00088-3).

- [75] Budhram A, Freeman E, Bhayana V, Yang L. Positive Predictive Value of Anti-GAD65 ELISA Cut-Offs for Neurological Autoimmunity. *Can J Neurol Sci* 2023;50:766–8. <https://doi.org/10.1017/cjn.2022.276>.
- [76] Alhajj M, Zubair M, Farhana A. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
- [77] Khan M, Shah SH, Salman M, Abdullah M, Hayat F, Akbar S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Chemiluminescent Immunoassay: A General Overview. *Glob J Med Pharm Biomed Update* 2023;18. https://doi.org/10.25259/GJMPBU_77_2022.
- [78] Cosma C, Padoan A, Plebani M. Evaluation of precision, comparability and linearity of MAGLUMI™ 2000 Plus GAD65 antibody assay. *J Lab Precis Med* 2019;4. <https://doi.org/10.21037/jlpm.2019.09.03>.
- [79] Musso G, Zoccarato M, Gallo N, Padoan A, Cosma C, Zuliani L, et al. Analytical evaluation of a GAD65 antibodies chemiluminescence immunoassay for CSF in neurological syndromes. *Clin Chem Lab Med CCLM* 2023. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0072>.
- [80] Musso G, Zoccarato M, Gallo N, Plebani M, Basso D. Hook-effect in MAGLUMI immunoassay for serum anti-GAD antibodies in neurological disorders: When “wrong” matrix is the right choice. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2024;558:119679. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119679>.
- [81] Joshi S, Yu D. Immunofluorescence. *Basic Sci. Methods Clin. Res.*, Elsevier; 2017, p. 135–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00008-4>.
- [82] *Laboratory Investigations. Textb. Pediatr. Rheumatol.*, W.B. Saunders; 2016, p. 117-128.e6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24145-8.00010-7>.
- [83] Humbel RL. LES ANTICORPS ANTI-GAD EN NEUROLOGIE 2021.
- [84] 07---LAKOMY-COLLOQUE-GEAI-2018-1530180734[11289].pdf n.d.
- [85] What are the different types of cell-based assays? Enzo n.d. <https://www.enzo.com/note/what-are-the-different-types-of-cell-based-assays/> (accessed June 14, 2024).
- [86] Guerra LL, Trabucchi A, Faccinetti NI, Iacono RF, Ureta DB, Poskus E, et al. Flow cytometric microsphere-based immunoassay as a novel non-radiometric method for the detection of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. *The Analyst* 2014;139:3017–25. <https://doi.org/10.1039/c3an02243a>.
- [87] Blöcker I-M, Mindorf S, Stöcker W, Balint B, Meinck H-M, Komorowski L, et al. A new recombinant cell-based IFA for the determination of autoantibodies to GAD in stiff-person syndrome. *J Neuroimmunol* 2014;275:21. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.08.059>.
- [88] Dot Blot n.d. <http://www.bio-advance.com/index.php/dot-blot> (accessed June 10, 2024).
- [89] Déchelotte B, Muñoz-Castrillo S, Joubert B, Vogrig A, Picard G, Rogemond V, et al. Diagnostic yield of commercial immunodots to diagnose paraneoplastic neurologic syndromes. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2020;7:e701. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000701>.

- [90] Graus F, Vogrig A, Muñiz-Castrillo S, Antoine J-CG, Desestret V, Dubey D, et al. Updated Diagnostic Criteria for Paraneoplastic Neurologic Syndromes. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2021;8:e1014. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001014>.
- [91] Liimatainen S, Honnorat J, Pittock SJ, McKeon A, Manto M, Radtke JR, et al. GAD65 autoantibody characteristics in patients with co-occurring type 1 diabetes and epilepsy may help identify underlying epilepsy etiologies. *Orphanet J Rare Dis* 2018;13:55. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0787-5>.
- [92] Jarius S, Stich O, Speck J, Rasiah C, Wildemann B, Meinck HM, et al. Qualitative and quantitative evidence of anti-glutamic acid decarboxylase-specific intrathecal antibody synthesis in patients with stiff person syndrome. *J Neuroimmunol* 2010;229:219–24. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.07.019>.
- [93] Murinson BB, Butler M, Marfurt K, Gleason S, De Camilli P, Solimena M. Markedly elevated GAD antibodies in SPS: effects of age and illness duration. *Neurology* 2004;63:2146–8. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000145661.01675.a8>.
- [94] Dalakas MC, Rakocevic G, Dambrosia JM, Alexopoulos H, McElroy B. A double-blind, placebo-controlled study of rituximab in patients with stiff person syndrome. *Ann Neurol* 2017;82:271–7. <https://doi.org/10.1002/ana.25002>.
- [95] Dalakas MC. Stiff person syndrome: advances in pathogenesis and therapeutic interventions. *Curr Treat Options Neurol* 2009;11:102–10. <https://doi.org/10.1007/s11940-009-0013-9>.

AUTEUR : Nom : HAMIMED **Prénom :** Cherine

Date de Soutenance : 03/10/2024

Titre de la Thèse : Description des techniques de dosage des anticorps anti-GAD dans les syndromes neurologiques à anticorps anti-GAD : Etude TecSNAGAD

Thèse - Médecine - Lille 2024

Cadre de classement :

DES + FST ou option : Neurologie

Mots-clés : SNAGAD, GADA, RIA, ELISA, CBA, DOT, IFI.

Résumé :

Contexte : Les syndromes neurologiques associés aux anticorps anti-GAD (SNAGAD) sont rares, caractérisés par la présence de ces anticorps (GADA) dans le sérum et/ou le liquide cébrospinal (LCS). Plusieurs techniques biologiques sont utilisées pour leur détection (le RIA, le CBA, le DOT, l'ELISA et l'IFI), ciblant majoritairement l'isoforme GAD65. Cette étude vise à analyser les techniques de dosage et leurs résultats dans une cohorte nationale de patients atteints de SNAGAD.

Matériel et Méthodes : Étude rétrospective multicentrique, incluant des patients atteints de SNAGAD suivis entre 1998 et 2023, avec des données issues des centres spécialisés (CRMR de Lyon, CHU de Lille et Toulouse). Les techniques de dosage incluaient le RIA, ELISA, DOT, IFI et CBA dans le sérum et/ou le LCS. Les analyses portaient sur les résultats obtenus, la concordance inter-test et inter-matrice, la reproductibilité d'un même test ainsi que le suivi et la prise en charge des patients lillois.

Résultats : 293 patients ont été inclus, dont 61,4% ont eu un dosage couplé sérum/LCS. Sur une période d'environ 26 ans, le nombre de dosage et de la diversité des tests utilisés progressaient. Le DOT (57%) et l'IFI (53,2%) étaient les plus utilisés dans le sérum, tandis que dans le LCS, l'IFI (68,9%) était la plus fréquente, suivie du CBA et du DOT. Une concordance supérieure à 90% a été observée entre l'IFI, le DOT, l'ELISA et le CBA. Seule une discordance de 12,8% était retrouvée entre le CBA et le DOT dans le LCS. Chaque technique a montré d'excellentes performances pour la détection des GADA, allant de 93 à 100%, sauf le RIA qui présentait une sensibilité légèrement inférieure. Les titres de GADA étaient souvent supérieurs aux seuils maximaux de détection, nécessitant des dilutions itératives pour obtenir un titre exact et s'affranchir de l'effet crochet.

Conclusion : Les techniques de dosage des GADA montrent de bonnes performances, avec des résultats majoritairement concordants. Nous proposons une standardisation des techniques, avec un DOT initial suivi d'un ELISA pour le diagnostic, dans le sérum et le LCS. Le CBA reste complémentaire en cas de doute diagnostique.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Pascal PIGNY

Assesseurs : Madame la Professeure Hélène ZEPHIR
Monsieur le Professeur Bastien JOUBERT
Madame la Docteure Stéphanie ROGEAU

Directeur : Madame la Docteure Tifanie ALBERTO