

LES ANTICORPS ANTI-GAD EN NEUROLOGIE

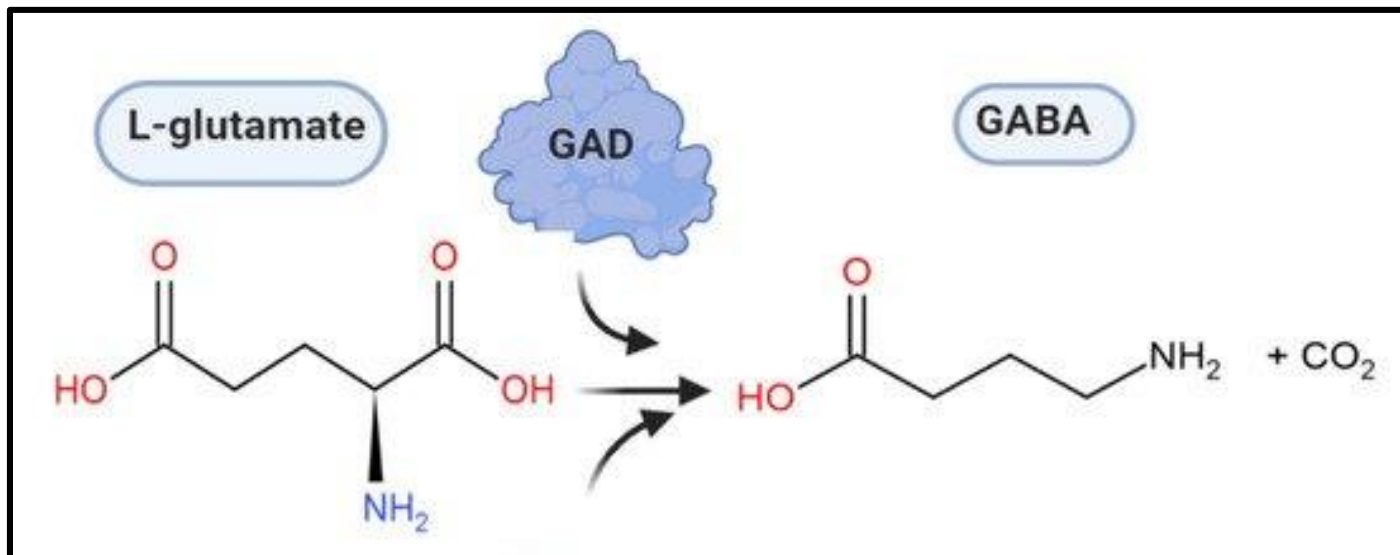
EXPERIENCE PERSONNELLE

**René Louis HUMBEL
Luxembourg**

Novembre 2021

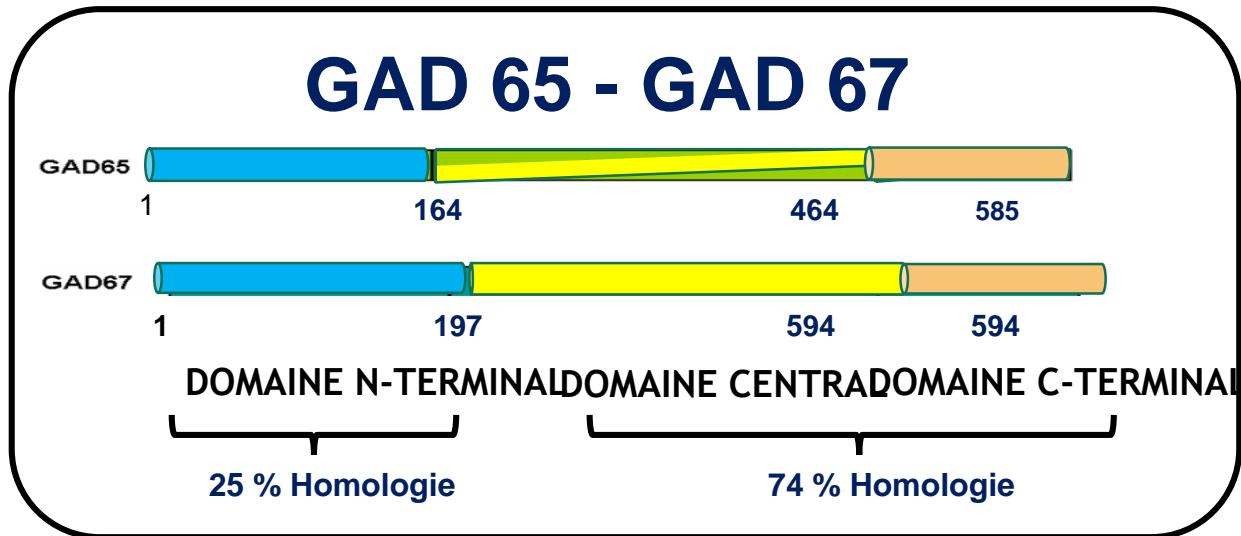
ANTICORPS ANTI-GAD

La GAD (glutamate décarboxylase) est une enzyme, qui catalyse la conversion de l'acide glutamique en acide gamma aminobutyrique (le GABA), un neurotransmetteur très important



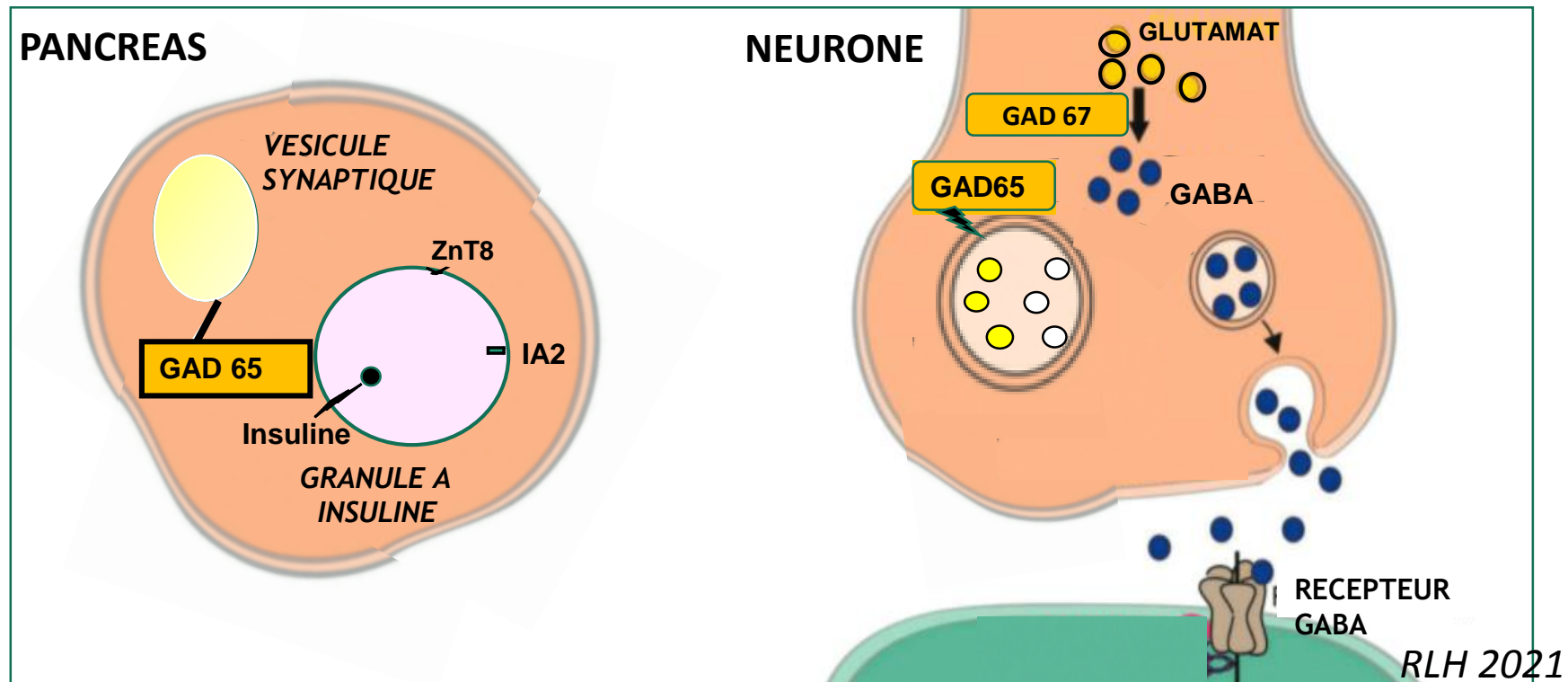
Il existe 2 isoformes de GAD: la GAD65 et la GAD67 codées respectivement par les gènes *GAD2* et *GAD1*.

Les GAD65 et GAD 67 ont une structure similaire consistant en 3 domaines. Un domaine amino-terminal, un domaine central et un domaine carboxy-terminal. Le domaine N-terminal comporte le site de liaison aux membranes. Le domaine central contient le site de liaison du co-facteur pyridoxal phosphate (PLP) qui assume l'activité catalytique du complexe. Il existe une homologie de structure de 74% pour les domaines C-terminaux et 25% pour les domaines centraux. Malgré ces structures communes GAD65 et GAD67 diffèrent par leur localisation au sein de la cellule, leur activité enzymatique et leur antigénicité. La GAD65 est hautement chargée et possède une grande flexibilité dans le domaine C-terminal ce qui permet un accès plus facile au co-facteur ce qui assure l'activation enzymatique. La GAD67 représente la forme soluble libre dans le cytoplasme cellulaire, alors que la GAD 65 est associée à la membrane des vésicules synaptiques grâce à un site de liaison présent sur l'extrémité N-terminale.



La GAD65 est exprimée dans les vésicules synaptiques des cellules β des îlots du pancréas. Cette localisation est donc différente de celle des autres autoantigènes pancréatiques (Insuline, IA2 et ZnT8) reconnus dans le diabète. Il n'y a pas de GAD67 dans le pancréas des primates..

Les deux isoformes de la GAD sont exprimés dans les neurones à l'extrémité pré-synaptique des terminaisons nerveuses. La GAD67 est libre dans le cytoplasme où elle synthétise le GABA à des fins métaboliques alors que la GAD65 est ancrée dans la membrane des vésicules synaptiques et assure la synthèse de GABA pour la transmission synaptique.



ANTICORPS ANTI-GAD

Les autoanticorps anti-GAD sont produits dans 2 affections différentes, le **diabète insulino-dépendant** et les maladies neurologiques regroupées dans les '**Troubles du spectre des maladies neurologiques avec anti-GAD**'.

Le diabète de type1, insulino-dépendant, apparaît généralement chez les très jeunes enfants ou le jeune adulte, quelque fois aussi à l'âge adulte. C'est une maladie autoimmune avec production d'autoanticorps contre les îlots pancréatiques. Il existe 2 grands types d'anticorps, ceux dirigés contre les vésicules synaptiques renfermant la GAD65 et les granules à insuline qui expriment les autres autoantigènes, IA2, et ZnT8.

Les troubles neurologiques avec anti-GAD comportent différentes maladies :

- Le Syndrome de la Personne Raide (Stiff-Person Syndrome)

- L' Ataxie Cérébelleuse

- L' Epilepsie Autoimmune

- L' Encéphalite Limbique

- L' Encéphalomyélite Progressive avec Ridigidité

- Le Nystagmus Downbeat

TROUBLES NEUROLOGIQUES AVEC ANTI-GAD

Le nom de syndrome de la personne raide (Stiff-Person Syndrome) a remplacé celui de syndrome de l'homme raide (Stiff-Man Syndrome) en raison de la fréquence plus élevée de cas chez les femmes. La maladie est caractérisée par une raideur progressive des muscles du dos et des membres qui sont responsables d'une posture figée avec hyperlordose. S'y ajoutent des spasmes musculaires douloureux et une hyperréflexie.

L'ataxie cérébelleuse se manifeste par une ataxie de la marche, une dysarthrie sévère, une dysphagie et un dysfonctionnement oculomoteur.

L'épilepsie est une épilepsie temporale, partielle continue, réfractaire aux traitements et des états de mal convulsifs.

L'encéphalite limbique débute par une altération de la mémoire, des symptômes psychiatriques et des convulsions.

L'encéphalomyélite progressive avec rigidité associe rigidité et atteintes de la moelle épinière avec myoclonies, ataxie, vertige et symptômes sensoriels.

Le nystagmus downbeat est un nystagmus horizontal ou en battement bas persistant. Il peut être accompagné d'opsoclonies et de myoclonies.

Une origine paranéoplasique de ces maladies est d'environ 10% et concerne des cancers de poumon, thymus, pancréas, sein et lymphome.

Environ 30% de ces troubles neurologiques sont associés à un diabète de type 1

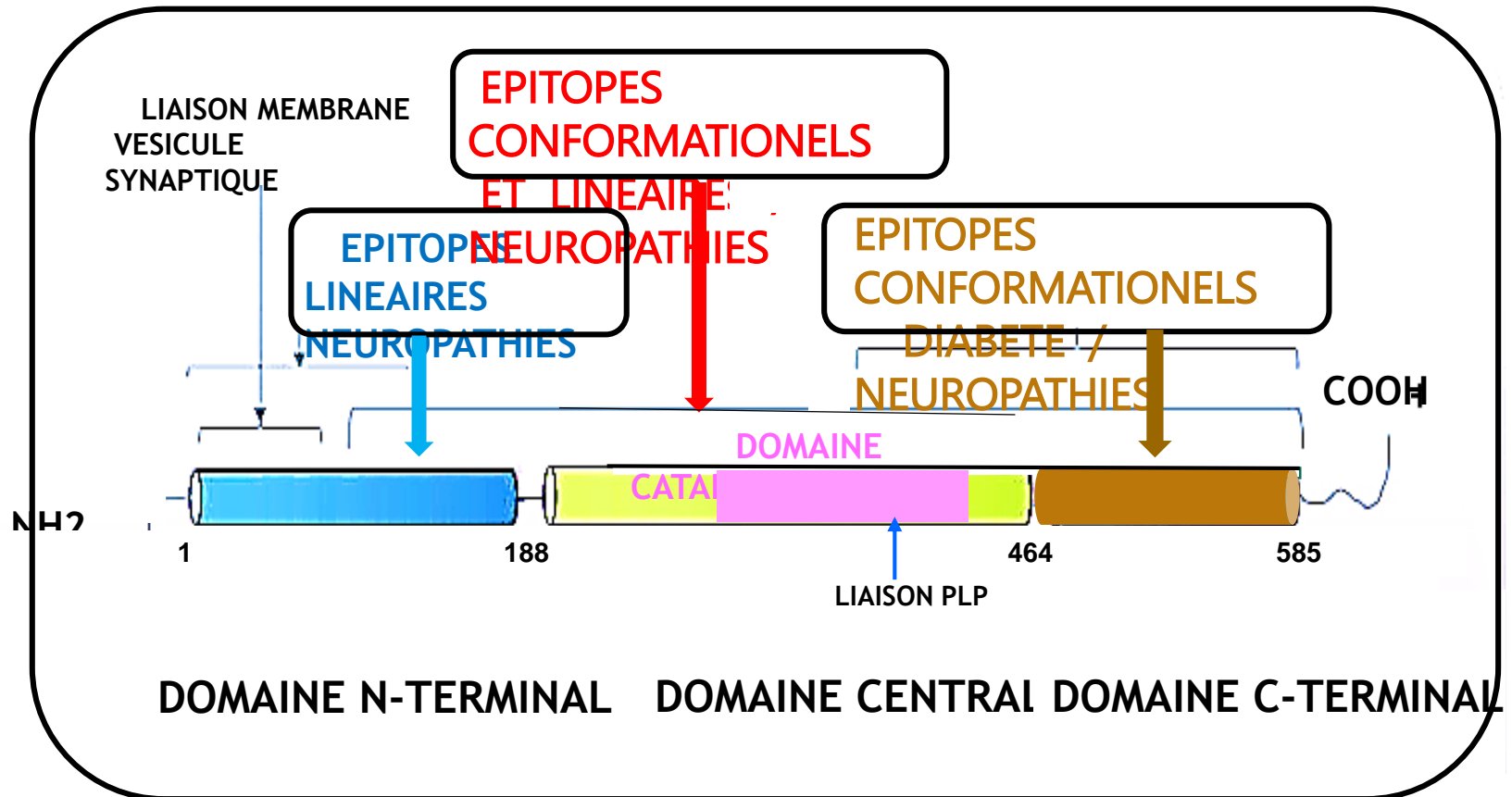
LES ANTICORPS ANTI-GAD

Les anticorps anti-GAD associés au diabète 1 et ceux produits dans les maladies neurologiques sont différents aussi bien dans leur titre que dans leur spécificité et ceci influe grandement sur leurs méthodes de recherche.

Les anti-GAD du diabète ne reconnaissent que la GAD65 avec des titres moyennement élevés. Les déterminants antigéniques sont représentés par des épitopes liés à la conformation native de la GAD65 et localisés sur les domaines centraux et C-terminaux.

Les anticorps anti-GAD des maladies neurologiques réagissent aussi bien avec la GAD65 que la GAD67 avec des titres très élevés, et reconnaissent des épitopes conformationnels présents sur les trois domaines, mais essentiellement des épitopes linéaires sur le domaine N-terminal.

REACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-GAD65



METHODES DE RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-GAD

Les anticorps anti-GAD peuvent être recherchés par différentes méthodes qui doivent être soigneusement sélectionnées en fonction de la maladie à rechercher, diabète ou troubles neurologiques.

Pour le diabète de type 1 il faut faire appel aux méthodes permettant la détection des anticorps reconnaissant les épitopes conformationnels de la GAD65 c.a.d. celles utilisant comme antigène de la GAD sous sa configuration moléculaire native. Les techniques RIA et ELISA, actuellement commercialisées, utilisent pour cela de la GAD65-Biotinylée qui est mise en contact avec le sérum en phase liquide. L'immunodot ne convient pas.

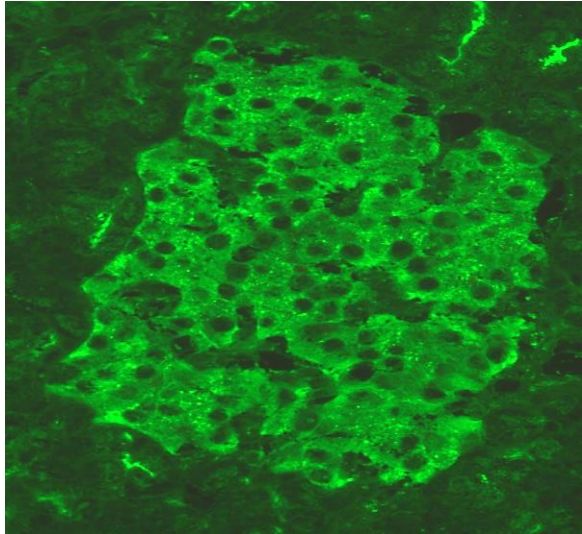
Pour les anticorps anti-GAD associés aux maladies neurologiques on peut utiliser les méthodes qui reconnaissent les épitopes conformationnels et linéaires. En raison des taux très élevés de ces anticorps certaines de ces méthodes sont très sensibles aux phénomènes de pro-zone.

METHODES DE RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-GAD

	<u>DIABETE 1</u>	<u>M.NEUROLOGIQUES.</u>
Immunofluorescence : Pancréas	+	+
Cervelet	-	+
Cel.Transfectées GAD65	-	+
RIA GAD65 Biotinylée	+	+
ELISA GAD65 Biotinylée	+	+
ELISA GAD65 immobilisé	-	+
IMMUNODOT	-	+

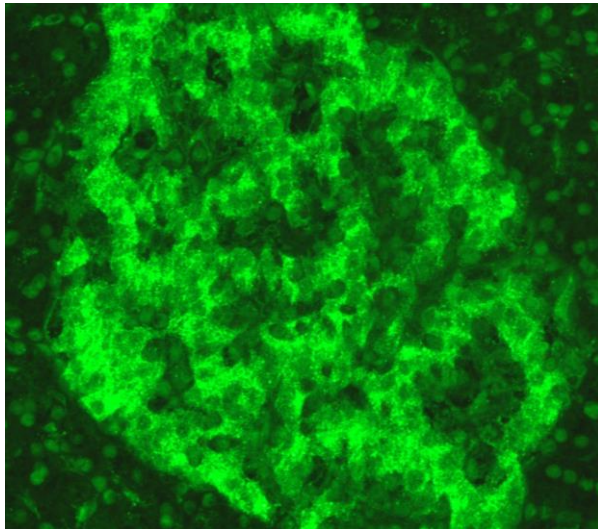
ANTICORPS ANTI-GAD 65

IMMUNOFLUORESCENCE SUR PANCREAS DE PRIMATE



DIABETE

L'immunofluorescence indirecte (IF) sur pancréas de primate montre un marquage des îlots de Langerhans, généralement l'ensemble des cellules. La sensibilité de l'IF est relativement faible obligeant l'utilisation de dilutions peu élevées du sérum, une incubation prolongée avec la coupe de pancréas et une anti-globuline IgG de haute avidité.



TROUBLES NEUROLOGIQUES

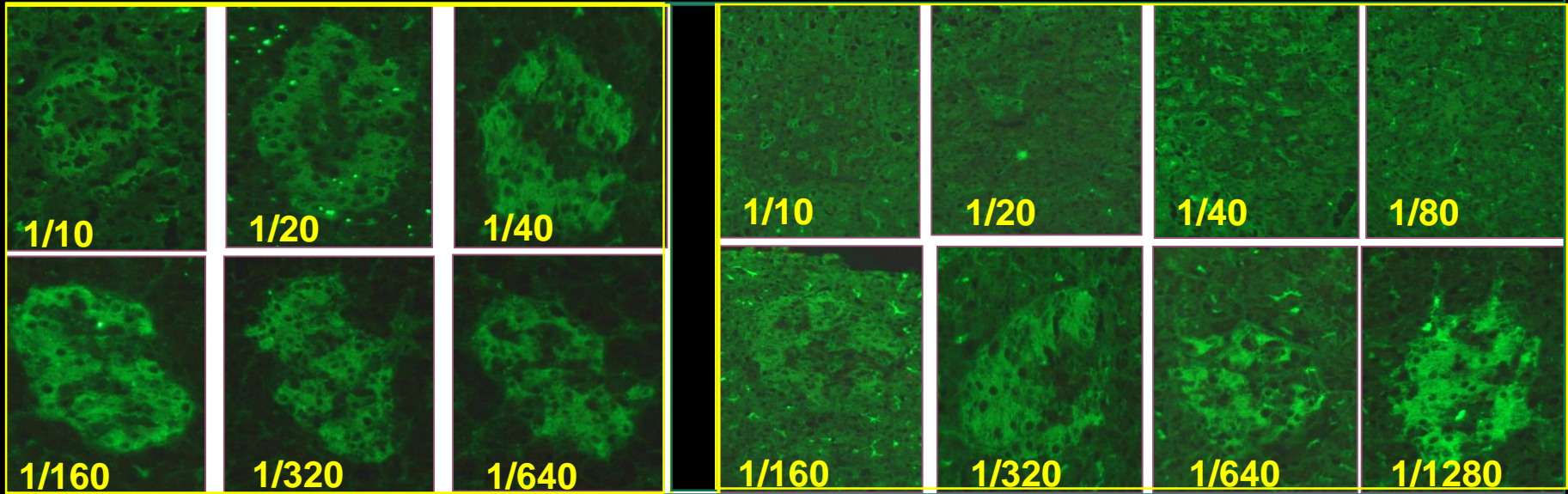
En IF sur coupes de pancréas on note un marquage spécifique des cellules β . En raison des titres très élevés des anti-GAD, les phénomènes de pro-zone sont habituels. Il est donc indispensable de tester des dilutions de sérums assez élevés

ANTICORPS ANTI-GAD 65

IMMUNOFLUORESCENCE SUR PANCREAS DE PRIMATE

PATIENTS AVEC TOUBLES NEUROLOGIQUES AVEC GAD

Etude de 2 cas avec des concentrations très élevées d'anticorps anti-GAD montrant l'importance du phénomène de pro-zone

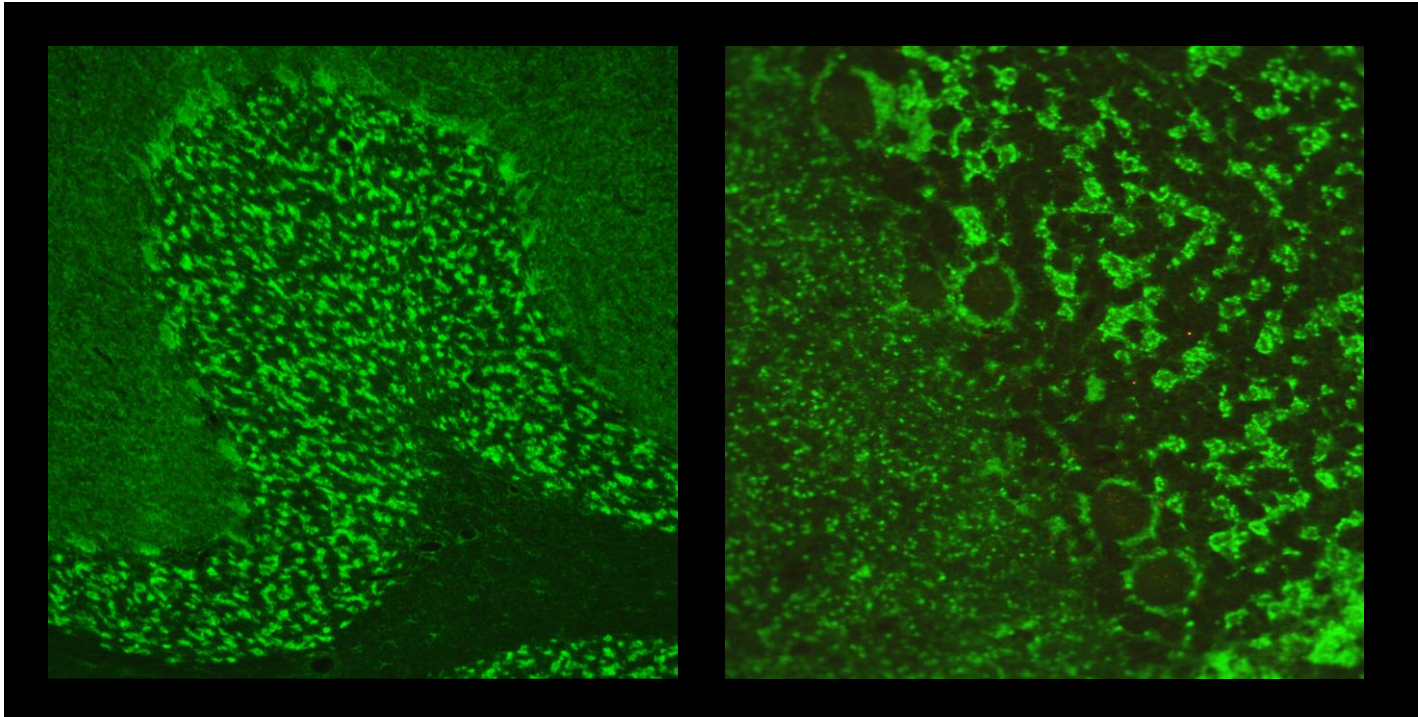


Dilutions du sérum

ANTICORPS ANTI-GAD 65

IMMUNOFLUORESCENCE SUR CERVELET

Les anticorps anti-GAD associés aux troubles neurologiques, mais pas ceux du diabète, sont décelables sur les coupes de cervelet



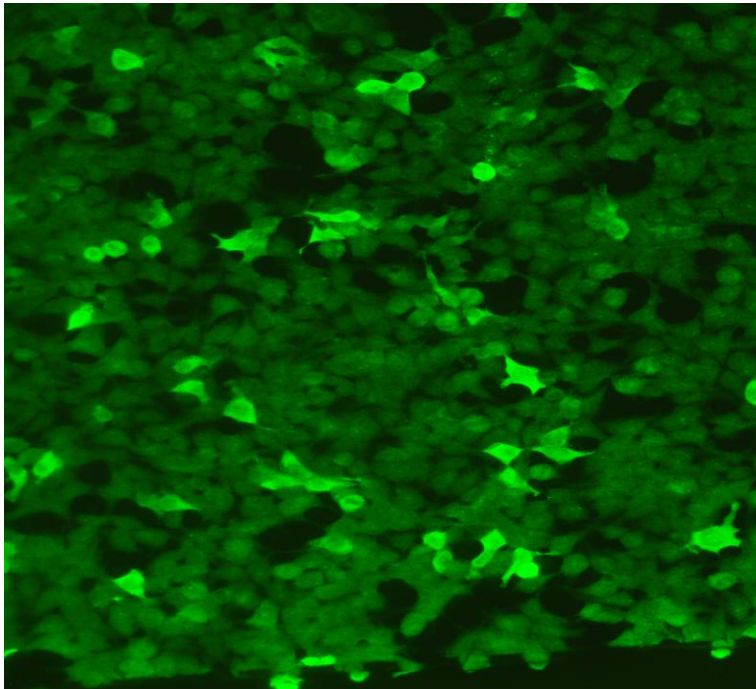
L'IF sur coupes de cervelet de singe montre un marquage très caractéristique de la périphérie des neurones de la couche granulaire et les cellules de Purkinje, ainsi que des granulations isolées dans couche moléculaire.

ANTICORPS ANTI-GAD65

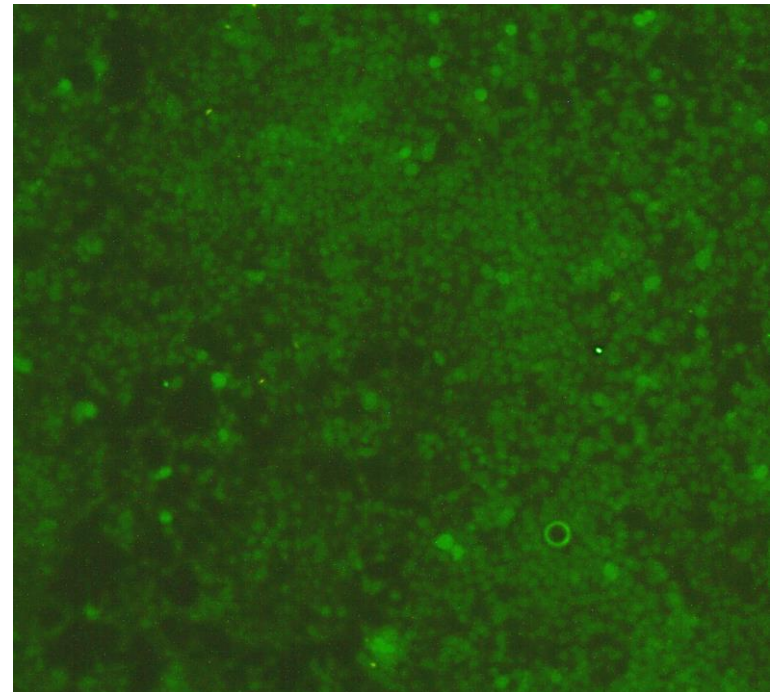
IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES TRANSFECTEES

Des cellules transfectées avec le gène de la GAD65 sont également disponibles . Elles ne reconnaissent que les anticorps des maladies neurologiques, pas ceux du diabète.

TROUBLES NEUROLOGIQUES



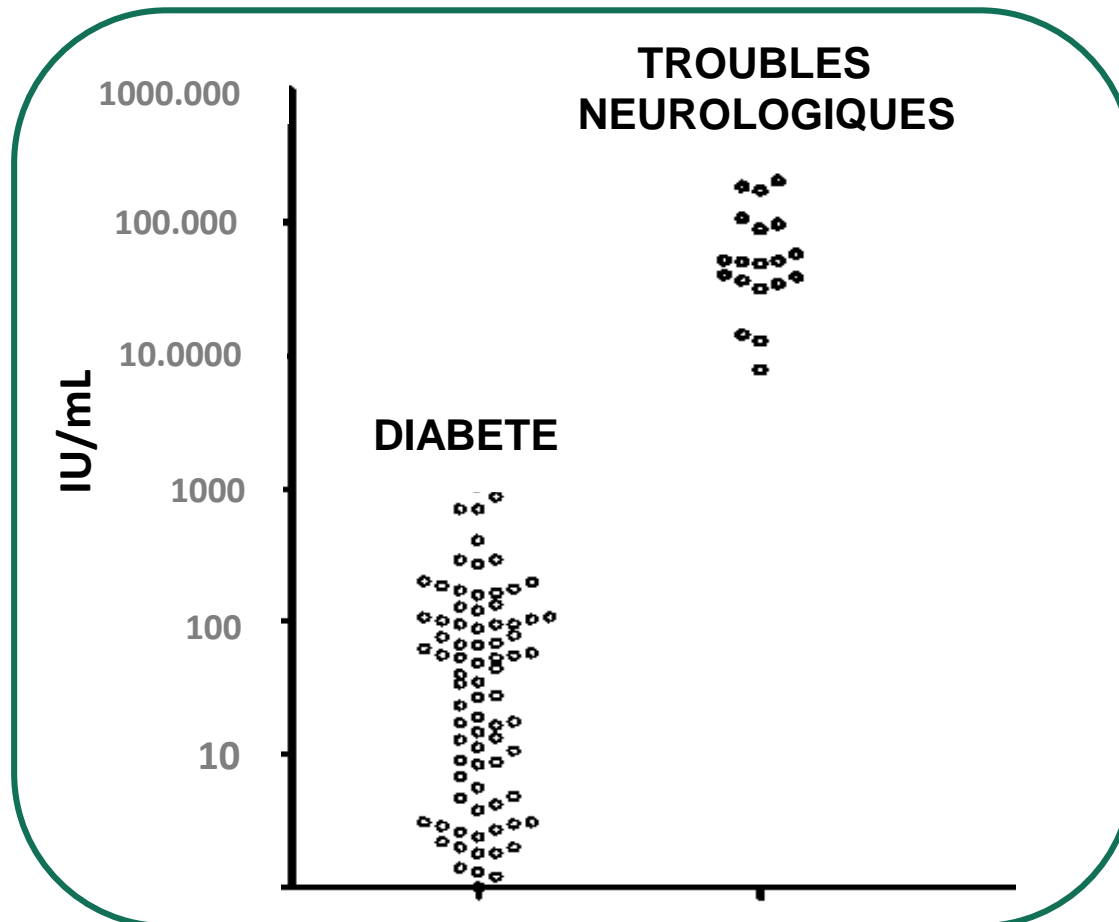
DIABETE 1



ANTICORPS ANTI-GAD 65

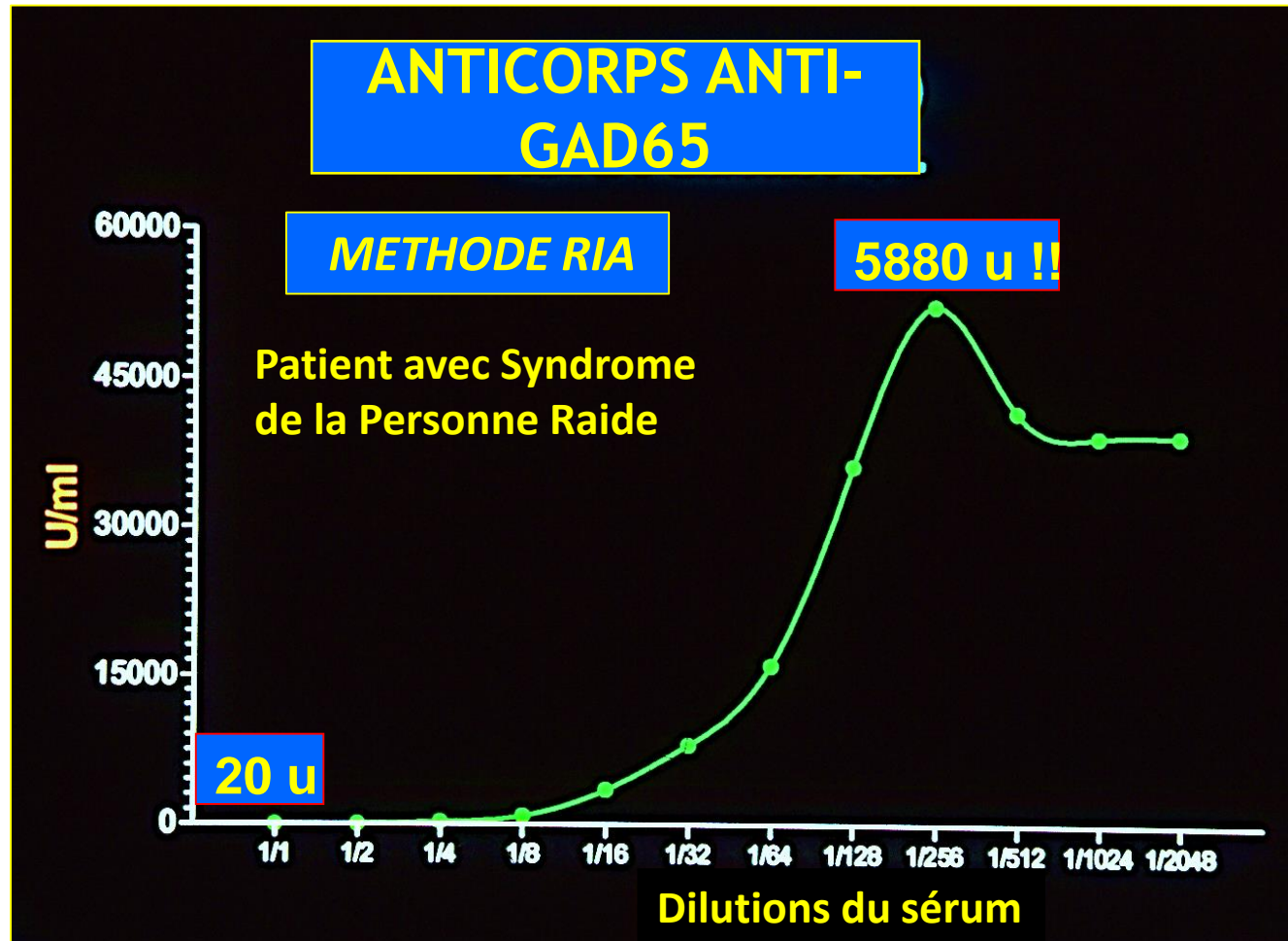
METHODE RIA

Dans les maladies neurologiques, les résultats sont très fortement supérieurs à ceux que l'on observe dans le diabète



ANTICORPS ANTI-GAD 65

La méthode RIA utilisée pour les anticorps anti-GAD est fortement sensible aux phénomènes de pro-zone. Ainsi, un résultat tout à fait négatif, ou très faible, avec la quantité de sérum habituelle du test, peut se révéler considérablement élevé aux dilutions supérieures.

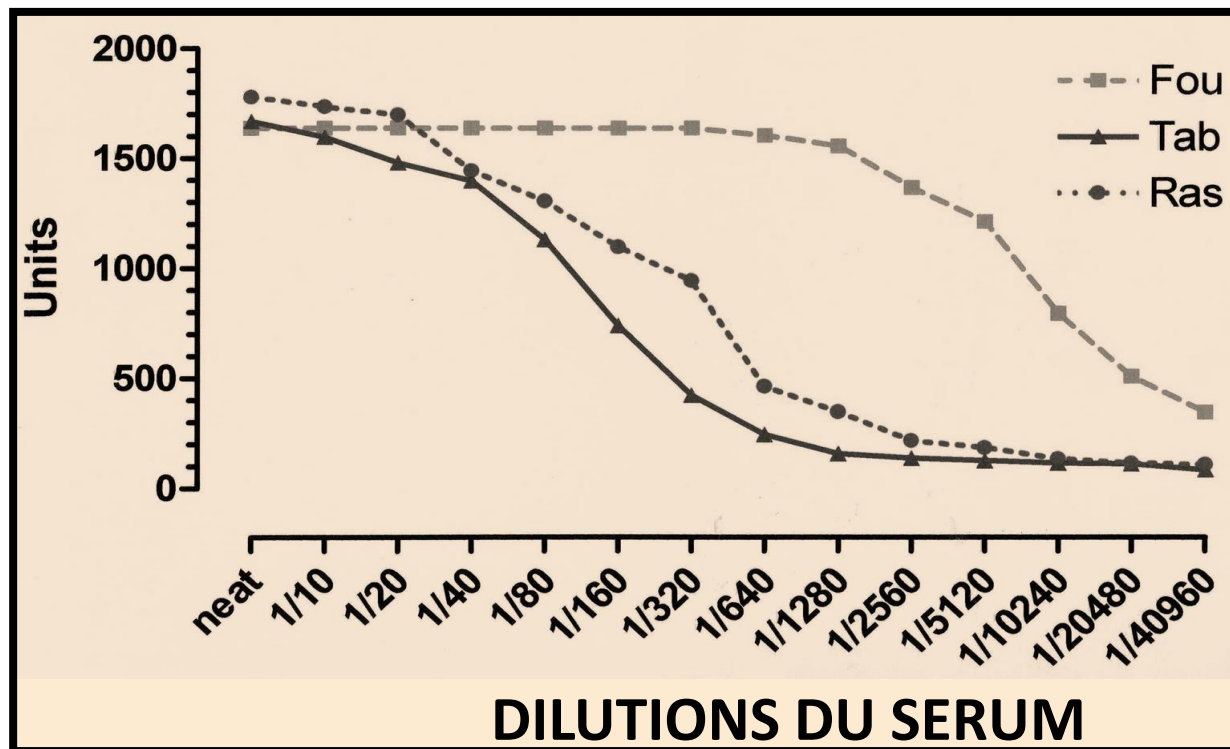


ANTICORPS ANTI-GAD 65

METHODE ELISA GAD Biotinylée

PATIENTS AVEC TROUBLES NEUROLOGIQUES AVEC GAD

Avec l'ELISA il n'y a pas de phénomène de pro-zone mais une valeur supérieure au dernier point de la courbe de calibration doit impérativement conduire à la répétition du test avec des dilutions du sérum pour définir les titres très élevés.

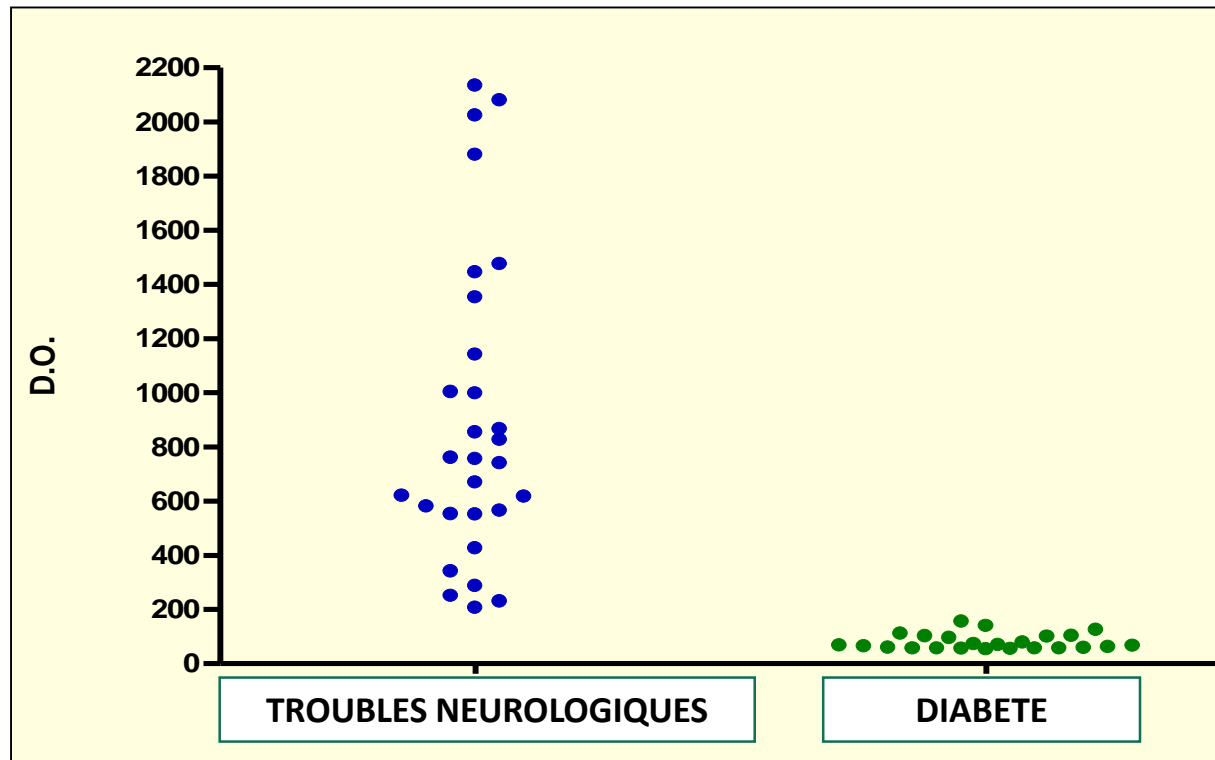


ANTICORPS ANTI-GAD 65

METHODE ELISA DIRECT

rGAD65 directement immobilisé

Nous avons développé une technique ELISA basée sur l'utilisation de GAD65 recombinante directement immobilisée sur la plaque et qui ne détecte que les anticorps des maladies neurologiques et pas ceux du diabète.

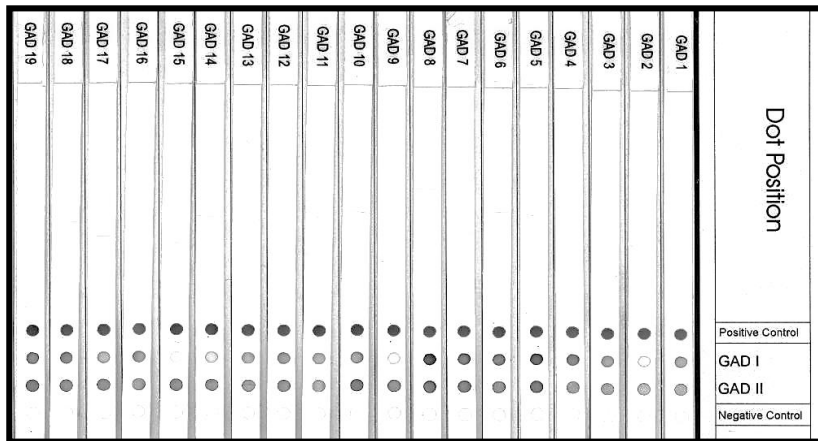


ANTICORPS ANTI-GAD

IMMUNODOT ANTI-GAD65/67

L'immunodot permet la détection des anticorps anti-GAD65 et, pour plupart aussi, des anti-GAD67 des troubles neurologiques. Cette méthode ne reconnaît pas les anti-GAD65 associés au diabète 1.

TROUBLES NEUROLOGIQUES



DIABETE TYPE 1



DOT DTEK/ALPHADIA GAD1=GAD67 GAD2=GAD65

ANTICORPS ANTI-GAD

MMUNODOT ANTI-GAD65 / GAD67

PATIENTS AVEC TROUBLES NEUROLOGIQUES GAD



42 GAD65 +

41 GAD65 + GAD67 + (8 GAD67 Faible)

1 GAD65 + GAD67 -

ARTICLES RECENTS

Baizabal JF. et al. The neurological syndromes associated with glutamic acid Decarboxylase antibodies. J.Autoimmunity 2019,101:35-47

Graus F .et al. GAD Antibodies in neurological disorders-insights and challenges. Nat.Rev.Neurol. 2020;16:353-365

Dade M. et al. Neurological syndromes associated with anti-GAD antibodies, Int. J. Mol. Sci. 2020;21: 3701-3722

Munoz-Lopetegi A.et el. Neurologic syndromes related to anti-GAD65 Neurol.Neuroimmunol.Neuroinflamm 2020,7:2-13

Budhram A. et al. Clinical spectrum of high-titre GAD65 antibodies Neurol Neurosurg Psychiatry 2021;92:645-654

Tsiortou P. et al. GAD antibody spectrum disorders : progress in clinical phenotypes Ther Adv Neurol Disord 2021;14:1-17