

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 décembre 2005 (29.12.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/124344 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/53

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2005/006088

(22) Date de dépôt international : 6 juin 2005 (06.06.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
PCT/EP2004/006174 8 juin 2004 (08.06.2004) EP

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES** [BE/BE]; Route de Lennik 808, B-1070 Bruxelles (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MAS-CART, Françoise** [BE/BE]; Avenue Jacques Pastur 160, B-1180 Bruxelles (BE). **OCMANT, Annick** [BE/BE]; Chaussée de Soignies 34J, B-7070 Le Roeulx (BE).

(74) Mandataire : **BRANTS, Johan, Philippe, Emile**; De Clercq, Brants & Partners, E. Gevaertdreef 10a, B-9830 Sint-Martens-Latem (BE).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING ANTI-TRANSGLUTAMINASE ANTIBODIES

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION D'ANTICORPS ANTI-TRANSGLUTAMINASE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting anti-transglutaminase antibodies in a saliva sample containing said antibodies consisting in pre-treating said saliva sample, in subsequently detecting the antibodies in the pre-treated saliva by means of an immune reaction with a transglutaminase under conditions suitable for forming immuno-complexes with said antibodies. A method for diagnosing or therapeutically controlling a coeliac disease is also disclosed.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de détection d'anticorps anti-transglutaminase dans un échantillon de salive susceptible de contenir lesdits anticorps, caractérisé en ce que l'on soumet l'échantillon de salive à un prétraitement, puis en ce que l'on détecte lesdits anticorps dans la salive prétraitée par une réaction immunitaire avec de la transglutaminase dans des conditions appropriées pour la formation d'immuno-complexes avec lesdits anticorps. Elle concerne aussi un procédé de diagnostic ou de suivi thérapeutique de la maladie coeliaque.

WO 2005/124344 A2

Procédé de détection d'anticorps anti-transglutaminase

Domaine de l'invention

L'invention concerne un procédé de détection d'anticorps anti-transglutaminase dans la salive pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de la maladie coeliaque.

5 Arrière plan technologique de l'invention

La maladie coeliaque est une entéropathie auto-immune induite par le gluten chez des sujets génétiquement prédisposés. Le gluten est la fraction protéique de l'endosperme du blé, du seigle, de l'orge et de l'avoine. La farine de blé, fabriquée à partir de l'endosperme, contient diverses protéines dont la gliadine, protéine de la famille des prolamines, qui est
10 l'antigène alimentaire responsable de la maladie.

Il y a d'une part des facteurs génétiques prédisposants à la maladie coeliaque, en effet, la contribution des gènes HLA est bien démontré, et il y a d'autre part, un ou des facteurs déclenchants environnementaux d'origine indéterminée.

La phase active de la maladie est associée à la production d'anticorps anti-gliadine, et
15 d'auto-anticorps, les anticorps anti-endomysium. Ces auto-anticorps sont dirigés contre le tissu conjonctif qui entoure les fibres de muscle lisses. L'antigène reconnu par les anticorps anti-endomysium est une enzyme, la transglutaminase tissulaire, découverte récemment par l'équipe de Dieterich. Cette enzyme semble être impliquée dans la pathogénèse de la maladie : la transglutaminase catalyse la liaison covalente des protéines entre un résidu
20 lysine et un résidu glutamine. Il a donc été suggéré que la liaison de la transglutaminase à la gliadine ou à certains peptides de la gliadine induit la formation de néo-antigènes reconnus par le système immunitaire et ainsi la production d'auto-anticorps contre la transglutaminase.

Dans sa forme classique, la maladie coeliaque est caractérisée par une atrophie villositaire
25 totale ou subtotale prédominant au niveau de l'intestin grêle proximal et secondaire à l'ingestion de gluten.

Le nourrisson ou le jeune enfant présente une diarrhée chronique avec le plus souvent un ralentissement de la croissance et un abdomen ballonné. Plus rarement, chez l'enfant plus

âgé, la maladie peut être moins typique, limitée à une petite taille isolée, une anémie ferriprive chronique, des anomalies de l'émail dentaire ou des arthralgies.

Les symptômes de la maladie, chez l'adulte, sont quant à eux très variables. Les signes habituels sont, comme chez l'enfant, la diarrhée et un amaigrissement inquiétant. Plus
5 souvent que chez ce dernier, la maladie est mono-symptomatique (anémie ferriprive, ostéoporose,...) ou atypique (se manifestant par des crampes musculaires, une stomatite aphteuse, des irrégularités menstruelles voire des fausses couches à répétition, un état dépressif).

A côté des formes classiques de la maladie qui ne représenteraient qu'une minorité des cas,
10 nombreux sont les malades qui en l'absence de signes cliniques majeurs, présentent une atrophie villositaire importante de la muqueuse jéjunale. Ces formes pauci-symptomatiques de la maladie coeliaque se manifestent cliniquement le plus souvent sous forme d'une anémie liée à une carence en fer et/ou en acide folique ou sous forme d'une ostéoporose ou d'une ostéomalacie.

15 Certaines personnes présentent un risque élevé de maladie coeliaque: membres de la famille des sujets atteints, malades présentant une dermatite herpétiforme, un diabète insulino-dépendant, une thyroïdite chronique auto-immune ou un déficit sélectif en IgA. Ce sont surtout des formes silencieuses de maladie coeliaque qui prédominent dans ces groupes.

20 La détection précoce des formes frustes voir infracliniques de la maladie coeliaque est donc difficile et, cependant, importante afin d'éviter d'une part les complications liées au déficit nutritionnel secondaire à la malabsorption et d'autre part, le développement de lymphomes ou de carcinomes digestifs qui pourraient apparaître chez 15% des malades non traités.

25 La maladie coeliaque est observée surtout chez les caucasiens et plus fréquemment chez la femme. En général, elle se révèle dans la petite enfance. La prévalence de la maladie coeliaque en Europe, comprise entre 1/1000 et 1/2000 habitants, pourrait être en fait beaucoup plus élevée si on tenait compte des formes pauci-symptomatiques et silencieuses de la maladie, ce qui ramènerait la prévalence de la maladie entre 1/200 à 1/400.

La détection de deux types d'anticorps sériques, les anticorps anti-endomysium d'une part, les anticorps anti-gliadine d'autre part, constitue à l'heure actuelle un bon test de dépistage de la maladie coeliaque. Les IgA anti-endomysium représentent le marqueur le plus fiable pour la détection de la maladie coeliaque. La sensibilité de ce test est supérieure à 90% et sa spécificité est proche de 100%. Ces anticorps sont recherchés par une technique d'immunofluorescence indirecte sur coupes d'œsophage de primates ou sur des coupes de cordons ombilicaux humains. La présence dans le sérum des patients atteints de la maladie coeliaque d'anticorps anti-gliadine est connue depuis longtemps, la détection de ceux-ci se fait par immuno-essais, mais le manque de spécificité de ce test en fait un outil diagnostique peu fiable s'il est utilisé isolément. La recherche des IgG anti-gliadine est un test sensible mais peu spécifique, alors que celle des IgA est plus spécifique mais moins sensible, entre autre du fait de la fréquence élevée du déficit en IgA chez les patients coeliaques.

Il existe également des immuno-essais permettant la mise en évidence d'anticorps IgA anti-transglutaminase dans le sérum. Ces tests utilisent de la transglutaminase soit de foie de cobaye, soit humaine recombinante, cette dernière permettant d'obtenir une spécificité comparable à celle des anti-endomysium.

Le seul élément de diagnostic formel repose sur l'histologie de la muqueuse intestinale. L'atteinte intestinale siège au niveau de l'intestin grêle proximal et associe de façon caractéristique une atrophie villositaire subtotale ou totale, une hypertrophie des cryptes, une infiltration lymphocytaire massive de l'épithélium et un infiltrat lymphoplasmocytaire du chorion, tous ces éléments sont responsables du syndrome de malabsorption.

Le fondement du traitement des patients atteints de la maladie coeliaque repose sur le régime strict sans gluten, régime qui est particulièrement difficile à suivre correctement. Lors de l'établissement du régime, les anticorps caractéristiques de la maladie coeliaque disparaissent progressivement du sérum, permettant ainsi d'évaluer le degré d'adhérence au régime. Ceci nécessite cependant à nouveau de réaliser une prise de sang.

La recherche des IgA anti-endomysium ou des IgA anti-transglutaminase dans le sang est une aide très précieuse au diagnostic de l'intolérance au gluten qui atteint en Europe environ une personne sur 300. Cependant, afin d'éviter de devoir réaliser une prise de sang, il serait intéressant de disposer d'un test réalisable sur des échantillons de salive.

Malheureusement, lorsque ce test a été précédemment appliqué par une technique de type ELISA à des échantillons de salive, les résultats obtenus ne permettaient pas de différencier les patients intolérants au gluten de ceux qui ne le sont pas. La technique RIA récemment décrite limite quant à elle son application à des laboratoires utilisant des produits radioactifs.

Le but de la présente invention est d'apporter une solution non-invasive pour le diagnostic et le suivi de la maladie cœliaque, par un test diagnostique économique et performant, susceptible de remédier, au moins partiellement aux inconvénients des solutions connues de l'art antérieur.

10 **Bref résumé de l'invention**

Le but ci-dessus est atteint par l'invention telle que définie par le jeu de revendications ci-joint.

A cet effet la présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou dosage d'anticorps anti-transglutaminase dans un échantillon de salive susceptible de contenir lesdits anticorps, caractérisé en ce que l'on collecte la salive dans un collecteur de salive évitant la dégradation des anticorps, que l'on soumet l'échantillon de salive à un prétraitement, puis en ce que l'on détecte lesdits anticorps dans la salive prétraitée par une réaction immune avec de la transglutaminase dans des conditions appropriée pour la formation d'immuno-complexes avec lesdits anticorps.

20 Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention comprend une technique immuno-enzymatique non radioactive performante pour la recherche des IgA anti transglutaminase dans la salive incluant un prétraitement des salives par une solution de composé mucolytique, de préférence la N-acétyl-cystéine, après avoir collecté celles-ci de façon appropriée. Les échantillons sont collectés d'une façon particulière évitant la 25 dégradation des anticorps.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le procédé comprend la collection des salives dans un dispositif d'échantillonnage puis le prétraitement de la salive échantillonnée qui comprend la mise en contact de la salive avec un composé mucolytique. Le composé peut être sélectionné dans le groupe comprenant la N-acétyl-cystéine, la 30 nacystelyn, le dithiothreitol, gelsolin, thioredoxin et EDTA.

Il s'agit de traiter les salives avec un composé mucolytique, de préférence de la N-acétylcystéine afin de dégrader les liaisons chimiques entre les molécules d'IgA et les mucines présentes dans la salive. Ce traitement permet de libérer les IgA des mucines, évitant ainsi un collage non spécifique conjoint des mucines sur les plaques de microtitration et
5 augmentant la détectabilité des IgA anti transglutaminase.

Ce prétraitement permet de diminuer la fixation non spécifique d'échantillons ne contenant pas d'anticorps anti-transglutaminase et d'augmenter le signal des échantillons contenant des anticorps anti transglutaminase permettant ainsi d'améliorer fortement la discrimination entre les salives positives et négatives pour la présence des IgA anti
10 transglutaminase.

En ne permettant que la fixation des IgA spécifiques sur une plaque couverte de transglutaminase et en améliorant la détection des IgA anti transglutaminase, nous obtenons une meilleure discrimination entre les salives des personnes intolérantes au gluten et celles de personnes qui ne sont pas intolérantes.

15 Une étape préalable du procédé selon l'invention consiste non seulement à collecter les salives dans des tubes spéciaux prévus à cet usage (dispositif d'échantillonnage), mais aussi à faire subir aux salives un prétraitement avant la recherche des anticorps par une technique immuno-enzymatique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le dispositif d'échantillonnage de
20 salive comprend: un collecteur d'échantillon qui reçoit sélectivement un échantillon de salive; et un indicateur activé par une quantité présélectionnée de l'échantillon de salive reçu pour indiquer que la quantité de l'échantillon de fluide biologique recueilli est adéquate. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la collection des salives dans des dispositifs d'échantillonnages tels que
25 décrit dans les documents WO95/02996, U.S. Patent No. 5,260,031, tels que Omni-SAL[®], dans les documents WO97/24979, WO96/04850, WO95/27205 tels que OraSure[®], dans le document U.S. Patent No. 4,774,962 tel que Salivette[®]. De préférence, le dispositif d'échantillonnage est sélectionné dans le groupe comprenant: Omni-SAL[®] (Saliva Diagnostic Systems, Inc.), Salivette[®] (Sarstedt Ltd.), Orapette[®] (Trinity Biotech) and
30 OraSure[®] (Epitope, Inc.), de préférence Omni-Sal[®].

D'autres particularités et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre et des exemples qui l'illustreront.

Brève description des figures :

La Figure 1 représente un schéma illustrant le principe des ELISA anti-transglutaminase
5 selon un mode de réalisation particulier de l'invention.

La Figure 2 représente un graphe comparant différentes concentrations en N-acétyl-cystéine selon un mode de réalisation particulier de l'invention.

La Figure 3 représente un graphe comparant des salives non traitées et traitées au N-acétyl-cystéine selon un mode de réalisation particulier de l'invention.

10 La Figure 4 représente un graphe comparant des salives non traitées et traitées au N-acétyl-cystéine selon un mode de réalisation particulier de l'invention avec de la TG de foie de cobaye.

Les Figures 5 et 6 représentent des graphes comparant des salives non traitées et traitées au N-acétyl-cystéine selon des modes de réalisation particuliers de l'invention avec un kit pré-
15 existant de dosage des anticorps anti-TG dans le sérum (Celikey, Pharmacia Diagnostics).

Les Figures 7 et 8 représentent des graphes comparant le niveau d'IgA anti-TG dans des salives non traitées et traitées au N-acétyl-cystéine chez des sujets contrôles en bonne santé (Figure 7) et chez des patients coeliaques non traités (Figure 8), selon des modes de réalisation particuliers de l'invention.

20 La Figure 9 représente un graphe comparant le niveau d'IgA anti-TG dans des salives non traitées et traitées au N-acétyl-cystéine chez des sujets contrôles en bonne santé et chez des patients coeliaques non traités, selon un mode de réalisation particulier de l'invention.

La Figure 10 représente un graphe comparant le niveau d'IgA anti-TG dans des salives traitées au N-acétyl-cystéine au niveau d'IgA anti-TG sérique, selon un mode de
25 réalisation particulier de l'invention.

La Figure 11 représente un graphe comparant le niveau d'IgA anti-TG dans des salives traitées au N-acétyl-cystéine chez des sujets contrôles sains, chez des sujets contrôles pathologiques et chez des patients coeliaques non traités selon un mode de réalisation particulier de l'invention.

La Figure 12 représente un graphe comparant le niveau d'IgA anti-TG dans des salives traitées au N-acétyl-cystéine chez des sujets contrôles sains, chez des patients coeliaques non traités et chez des patients coeliaques sous régime, selon un mode de réalisation particulier de l'invention.

5 Description détaillée de l'invention.

La méthode de l'invention utilise la salive humaine comme source non invasive, en lieu et place du sérum ou du sang invasif, pour détecter et/ou doser des anticorps anti-transglutaminase.

Les IgA sont les immunoglobulines prédominantes dans les sécrétions où elles jouent un rôle primordial dans la défense de l'organisme contre les agressions externes. L'essentiel des IgA dans la salive est présent sous une forme dimérique: l'IgA sécrétoire ou sIgA, constituée de deux IgA monomériques jointes par une petite molécule appelée "chaîne J" et d'une glycoprotéine sécrétoire appelée Composante Sécrétoire. L'IgA maintenue sous forme de dimère par la chaîne J est sécrétée par les plasmocytes sous-épithéliaux; elle se lie à la composante sécrétoire et traverse alors la barrière épithéliale. La composante sécrétoire facilite le transport de l'IgA dans les sécrétions et la protège contre la protéolyse.

La mise en évidence de la maladie coeliaque chez les patients présentant des formes paucisymptomatiques ou silencieuses de maladie coeliaque est souvent difficile et retardée. Néanmoins, ces patients voient une amélioration de leur état général lorsqu'ils sont mis sous régime.

Le dépistage à grande échelle se justifie donc au sein de la population générale mais ne peut se concevoir qu'en utilisant des tests peu invasifs. La présente invention permet de doser les anticorps IgA anti-transglutaminase par la technique ELISA sur des prélèvements salivaires.

La présente invention concerne un procédé de détection d'anticorps anti-transglutaminase dans un échantillon de salive susceptible de contenir lesdits anticorps, caractérisé en ce que l'on soumet l'échantillon de salive à un prétraitement. Dans un mode de réalisation préférée le procédé comprend d'une part la collection des salives dans un dispositif d'échantillonnage tel que des salivettes Omni-SAL[®] et d'autre part le prétraitement qui comprend la mise en contact de la salive avec un composé mucolytique tel que la N-acétyl

cystéine. La transglutaminase utilisée selon l'invention peut être d'origine humaine, animale, synthétique ou recombinante.

La détection peut être effectuée dans un immuno-essai, par exemple, par couplage direct ou indirect d'un partenaire de réaction ayant une substance de marquage facilement
5 détectable.

Selon un mode de réalisation préférée, la détection s'effectue dans un test ELISA. Par exemple, on peut mettre en contact les immuno-complexes formés avec un conjugué constitué par un anticorps marqué dirigé contre lesdits anticorps, dans des conditions appropriées pour la formation d'immuno-complexes marqués, puis on détecte et on
10 quantifie les immuno-complexes marqués. Par exemple le conjugué peut être un anticorps anti-immunoglobuline marqué à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase, puis on détecte et on quantifie la formation d'immuno-complexes marqués par colorimétrie ou fluorimétrie.

Le présent procédé permet la détection de maladies induites par le gluten telle que la
15 maladie coeliaque.

Le présent procédé permet aussi le suivi d'un régime sans gluten au cours duquel les anticorps doivent normalement disparaître.

La présente invention concerne donc aussi un procédé de diagnostic ou de suivi thérapeutique de la maladie coeliaque, caractérisé en ce qu'on détecte des anticorps anti-
20 transglutaminase dans un échantillon de salive susceptible de contenir lesdits anticorps, caractérisé en ce que l'on soumet l'échantillon de salive à un prétraitement, puis en ce que l'on détecte lesdits anticorps dans la salive prétraitée par une réaction immune avec de la transglutaminase dans des conditions appropriées pour la formation d'immuno-complexes avec lesdits anticorps. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé est
25 caractérisé en ce qu'il comprend la collection des salives dans des dispositifs d'échantillonnages tels que décrit dans les documents WO95/02996, U.S. Patent No. 5,260,031, tels que des salivettes Omni-SAL[®] puis le prétraitement qui comprend la mise en contact de la salive avec de la N-acétyl-cystéine.

La présente invention concerne aussi un kit diagnostique pour le diagnostic ou le suivi
30 thérapeutique de la maladie coeliaque. La présente invention concerne aussi une méthode

de dépistage et/ou de détection et/ou de surveillance de la maladie coeliaque chez un individu, ladite méthode comprenant la détection d'anticorps anti-transglutaminase dans un échantillon de salive provenant de l'individu. La présente invention se rapporte à une méthode qui, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser un prélèvement de sang, est à même de
5 faciliter le diagnostic d'une maladie coeliaque et de surveiller l'évolution de la maladie.

Ainsi, la présente invention se prête tant au dépistage qu'au contrôle de l'évolution chez les malades coeliaques sous régime sans gluten. Elle permet aussi de diagnostiquer toutes les maladies accompagnées d'une réaction immunitaire contre la transglutaminase ou des structures antigéniques ou analogues correspondantes.

Exemple 1

1. Matériels et méthodes

Prélèvements

Les tests sont effectués sur des échantillons de salive, prélevés en utilisant les salivettes
5 Omni-SAL[®]. Le tampon collecteur des salivettes est placé sous la langue jusqu'à ce que
l'indicateur devienne bleu. Le tampon imbibé est alors replacé dans un tube contenant un
liquide de conservation tamponné à pH neutre et la salive en est extraite à l'aide d'un filtre
de type piston. La salive est aliquotée et congelée à -80°C.

Principe des ELISA anti-transglutaminase

10 Le principe des ELISA anti-transglutaminase est schématiquement illustré à la Figure 1.
L'antigène transglutaminase soit purifié de foie de cobaye (technique maison), soit humain
recombinant (Celikey[™] PHARMACIA *Diagnostics*), a été adsorbé aux puits d'une plaque
de microtitration. Pendant une première incubation, les anticorps anti-transglutaminase
éventuellement présents dans les échantillons sont fixés à la transglutaminase sur la phase
15 solide. Après lavage, une deuxième incubation permet à un conjugué anti-IgA humaines
marqué à la peroxydase de se fixer sur l'anticorps anti-transglutaminase préalablement
immobilisé. Un lavage élimine le conjugué en excès. En présence du substrat chromogène,
les complexes antigène-anticorps-conjugué sont révélés par une réaction enzymatique
colorée. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est reportée sur une
20 courbe standard permettant ainsi une estimation de la concentration en anticorps anti-
transglutaminase.

**ELISA utilisant la transglutaminase purifiée de foie de cobaye selon un mode de
réalisation de l'invention.**

Matériel, Appareillage et Réactifs

25 Les appareillages utilisés pour la mise en œuvre des expériences comprennent: Lecteur de
plaques ELISA, PC avec logiciel de traitement pour le lecteur ELISA (KC⁴V3.1),
Réfrigérateur 2-8°C, Congélateur -25°C, Etuve 37°C, Vortex, Balance, pH mètre.

Le petit matériel utilisé comprend : Plaque ELISA (Nalge Nunc International) Nunc
IMMUNO Plate Brand Products Maxisorb surface, Micropipettes de 0 à 10, de 10 à 40, de

50 à 200, de 200 à 1000 µl, Micropipettes à multicanaux (8 canaux) de 50 à 200 µl, Aspire et vide pipettes pour pipettes de 2 à 10 ml, Pipettes à usage unique de 2 à 10 ml, Tubes en plastique à fond conique de 5 à 10 ml, Microtubes.

Les réactifs commerciaux utilisés aux cours de ces expériences comprennent : Tris HCl, NaCl, CaCl₂, HCl 5N, EDTA (Kestranal A), Tween 20, Citrate de sodium dihydraté, H₂O distillée, Transglutaminase purifiée de foie de cobaye (Sigma T5398), Standard IgA anti-transglutaminase à 10 000 UA dilution ½ dans l'éthylène glycol → 5 000 UA, Ethylène glycol 99% (14.675.28 Janssen Chimica), Conjugué anti-IgA humaines-peroxydase (anti-IgA HRP) de lapin (Dako P216), OPD (Sigma P6912), H₂O₂ 30%.

10 Les tampons suivants ont été employés :

Tampon de coating pH 7.5: CaCl₂ (0.7g), amené à 1 litre avec H₂O distillée et ajusté à pH 7.5 avec HCl 5N.

Tampon de dilution Tris pH 7.4 : Tris HCl (6.06g), NaCl (8.8g), EDTA (Kestranal A) (2.9g), amené à 1 litre avec H₂O distillée, additionné d'1 ml de Tween 20, et ajusté à pH 15 7.4 avec HCl 5N.

Tampon Citrate du substrat OPD pH 4.2 : C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (29.4g), amené à 1 litre avec H₂O distillée et ajusté à pH 4.2 avec HCl 5N.

Procédure

Coating des plaques

20 100 µl d'une solution de transglutaminase à 10 µg/ml de tampon de dilution ont été distribués par puits, la plaque a été couverte et incubée une nuit à 4°C La plaque a ensuite été lavée 3 fois avec le tampon de dilution. 100 µl de tampon de dilution sont distribués par puit et la plaque est incubée 2 heures à 37°C.

Dépôt des échantillons, de la courbe standard et du blanc

25 Dilutions du standard dans le tampon de dilution : Dilution 1/100 (100.00 UA) Dilution 1/400 (25.00 UA) Dilution 1/800 (12.50 UA) Dilution 1/1600 (6.25 UA) Dilution 1/6400 (1.56 UA). La fourchette des concentrations s'étend de 1.56 UA à 100 UA.

Le blanc est constitué du tampon de dilution.

100 µl de chaque point de la courbe (1/100, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/6400), des échantillons (salive non diluée) et du blanc ont été distribués par puits, puis incubés 2 h à T° ambiante, puis lavés 3 fois avec le tampon de dilution.

Détection et révélation

- 5 Le conjugué a été préparé à raison d'une dilution 1/1000 du conjugué dans le tampon de dilution. 100µl de cette solution ont été distribués par puits, puis incubés 1 heure à T° ambiante, puis lavés 3 fois avec le tampon de dilution.

- Le substrat a été préparé à raison de 20 ml d'une solution d'OPD à 1 mg/ml dans le tampon citrate et dans laquelle 40µl d'H₂O₂ ont été ajoutés. 200 µl de cette solution ont été
10 distribué par puits. La coloration est laissée se développer pendant 30minutes à T° ambiante à l'abri de la lumière.

Lecture : L'absorbance a été mesurée à 450 nm.

ELISA utilisant la transglutaminase recombinante humaine (Celikey™ Pharmacia Diagnostics)

15 Matériel, Appareillage et Réactifs

Les appareillages utilisés pour la mise en œuvre de ces expériences comprennent: Lecteur de plaques ELISA, PC avec logiciel de traitement pour le lecteur ELISA (KC⁴V3.1), Réfrigérateur 2-8°C, Vortex.

- Le petit matériel utilisé comprend : Puits de microtitration recouverts de transglutaminase
20 recombinante humaine, Micropipettes de 0 à 10, de 10 à 40, de 50 à 200, de 200 à 1000 µl, Micropipettes à multicanaux (8 canaux) de 50 à 200 µl, Aspire et vide pipettes pour pipettes de 2 à 10 ml, Pipettes à usage unique de 2 à 10 ml, Tubes en plastique à fond conique de 5 à 10 ml, Microtubes.

Les réactifs utilisés aux cours des expériences comprennent :

- 25 6 calibrateurs anticorps anti-transglutaminase à des concentrations de 0-3-7-16-40-100 U/ml dans du PBS contenant de la BSA, de l'azide de sodium 0.095 % (p/v), du détergent et du sérum humain, 1 ml chacun, prêt à l'emploi.

Le contrôle positif était constitué d'un tampon contenant de la BSA, de l'azide de sodium 0.095 % (p/v), du détergent et du sérum humain, 1 ml chacun, prêt à l'emploi.

Le contrôle négatif était constitué d'un tampon contenant de la BSA, de l'azide de sodium 0.095 % (p/v), du détergent et du sérum humain, 1 ml, prêt à l'emploi.

Le tampon de lavage concentré était constitué de PBS concentré 20x contenant de l'azide de sodium 0.095 % (p/v) et du détergent, 50 ml.

- 5 Le conjugué HRP IgA était constitué de conjugué anticorps anti-IgA humaines HRP, 15 ml, prêt à l'emploi.

Substrat TMB prêt à l'emploi 15 ml.

La solution d'arrêt était constituée de H_2SO_4 0.5 M, 10 ml, prêt à l'emploi.

Procédure

- 10 Les puits ont été rincés une fois avec du tampon de lavage immédiatement avant de les utiliser, puis 100 µl de calibrateurs, de contrôle et d'échantillons (salive non diluée) ont été distribués par puits. Les plaques Elisa ont été incubées pendant 30 minutes à T° ambiante, puis lavées 3 fois avec du tampon de lavage. 100 µl de solution de conjugué ont été distribués par puits, puis incubés pendant 30 minutes à T° ambiante et lavés 3 fois avec le
- 15 tampon de lavage. 100 µl de solution de substrat ont été ensuite distribués par puits, puis incubés 10 min à l'abri de la lumière à T° ambiante. 50 µl de solution d'arrêt sont finalement distribués par puits et l'absorbance a été mesurée à 450 nm entre 10 et 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

2. Résultats

- 20 **2.1 Mise au point de l'ELISA anti-transglutaminase sur des prélèvements salivaires selon un des modes de réalisation de la présente invention.**

Les premiers essais ont été réalisés en utilisant, *stricto sensu*, le protocole ELISA décrit ci-dessous.

- Les concentrations d'IgA totales dans le sérum (75 à 400 mg/100 ml) étaient environ 10
- 25 fois plus élevées que dans la salive (9 à 32 mg/100ml). Les résultats obtenus ont donc été comparés en testant la salive telle quelle (diluée 1/1) et la salive diluée 10 fois, cette dernière dilution équivalent donc à la dilution 1/100 d'un échantillon sérique telle que préconisée dans la technique initiale. Quatre coeliaques (C) et quatre individus contrôles (N) ont été testés. Il est apparu (Tableau 1) que la dilution 1/10 de la salive diminuait trop

la sensibilité puisque les DO, en particulier celles des cœliaques, étaient effondrées. La suite des expériences a été effectuée avec la dilution 1/1 (salive pure).

	Echantillons	DO	
		Dil 1/1	Dil 1/10
N	OCM	0,252	0,143
N	HAS	0,195	0,152
N	NAJ	0,233	0,061
N	SOP	0,159	0,04
C	DEC	0,146	0,025
C	BOU	0,332	0,064
C	NOE	0,484	0,115
C	VIL	0,405	0,118

Tableau 1. : Comparaison des dilutions 1/1 (non diluée) et 1/10 de la salive

Les différentes étapes du protocole ont été examinées afin de trouver les conditions optimales tant en terme de sensibilité qu'en terme de spécificité.

Pré-traitement de la salive à la NAC

La NAC (N-Acetyl-Cystéine) est un agent réducteur connu pour diminuer la viscosité des sécrétions bronchiques. Les mucines, glycoprotéines présentes dans la salive, peuvent d'une part fixer les IgA et d'autre part se déposer sur les plaques de microtitration et de ce fait être à l'origine du bruit de fond observé pour les échantillons négatifs.

Dans un premier lieu la concentration optimale de NAC nécessaire a été déterminée.

Les résultats de la détermination de la concentration optimale en NAC sont montrés au Tableau 2 et à la Figure 2.

	Echantillons	DO					
		non traités	traités NAC				
			105,8g/L	52,90g/L	26,45g/L	13,23g/L	6,61g/L
N	NAJ	0,233	2,663	0,219	0,166	0,138	0,173
N	HAS	0,213	1,049	0,214	0,143	0,145	0,196

Tableau 2 Evaluation de la concentration optimale en NAC

Dans un mode de réalisation préférée de l'invention la concentration optimale est de 13.23 g/L de tampon de dilution, en effet, c'est à cette concentration que les DO des contrôles sont les plus basses.

Comparaison des salives traitées aux non traitées

5 5µl d'une solution de NAC (Sigma Grade A7250) à 13.23 g/L dans le tampon de dilution pour 100µl de salive ont été utilisé pour obtenir une concentration finale de 0.625 g/L de salive, l'incubation des échantillons en présence de la NAC a été faite à T° ambiante durant 20 minutes.

Les résultats obtenus sont montrés au Tableau 3 et à la Figure 3.

	Echantillons	Essai 1 (DO)		Essai 2(DO)		Essai 3(DO)		Essai 4(DO)	
		non traités	traités	Non traités	Traités	non traités	traités	non traités	traités
N	NAJ	0,233	0,157	0,286	0,228	0,263	0,222		
N	HAS	0,213	0,164	0,340	0,277			0,282	0,273
N	ING			0,377	0,255	0,470	0,404		
N	SOP					0,391	0,325		
N	VIR					0,429	0,328		
N	OCM					0,406	0,376		
N	STE							0,421	0,421
N	J.MI							0,561	0,529
N	M.R							0,421	0,398
N	CAR							0,280	0,317
C	NOE			0,347	0,370			0,413	0,376
C	VIL					1,100	0,612	0,907	0,703
C	BOU					0,844	0,897	0,562	0,657
C	DEW							1,210	1,645
C	DEC							0,364	0,277
C	EXT							0,585	0,748
C	DEV							0,739	1,259
C	ZBI							0,762	1,557
C	COO							0,073	0,159
C	FON							0,586	0,746
C	GRE							0,271	0,272

Tableau 3 *Comparaison des salives non traitées et traitées NAC*

Le pré-traitement des salives à la NAC a permis de diminuer le signal des contrôles négatifs et d'augmenter celui des cœliaques, cet effet surprenant mène à une meilleure
 10 détection de ceux-ci et une discrimination plus importante entre les deux populations.

Pour démontrer l'effet de la NAC, c'est à dire la transformation des dimères d'IgA sécrétoires en monomères, une immunodiffusion radiale a été réalisée. La salive a été déposée sur un gel contenant un anticorps reconnaissant exclusivement les IgA sécrétoires. Après 5 jours d'incubation, un halo de précipitation a été observé pour les salives non
 15 traitées à la NAC correspondant à la réaction des IgA sécrétoires présentes dans la salive

avec l'anticorps inclus dans le gel. Par contre, pour les salives traitées à la NAC, le halo n'est pas observé ce qui signe l'absence d'IgA sécrétoires.

2.2 Comparaison des ELISA utilisant la transglutaminase soit purifiée de foie de cobaye (TG), soit humaine recombinante (Celikey™ Pharmacia.Diagnostics) (TG

5 Celikey)

Le bénéfice du pré-traitement des échantillons à la NAC a été évalué sur le Celikey, celui-ci utilisant la transglutaminase humaine recombinante. Il est actuellement admis, pour les échantillons sériques, que les ELISA utilisant la TG recombinante humaine sont plus spécifiques que ceux utilisant la TG de cobaye.

- 10 Les résultats obtenus sont montrés au Tableau 4 et aux Figures 4 (IgA anti TG), 5 (IgA anti TG Celikey) et 6.

		SANG		SALIVE			
	Echantillons	Endomysium	TG (UA)	TG (UA)	TG NAC (UA)	TG (Celikey) (U/ml)	TG NAC (Celikey) (U/ml)
Valeur seuil				21	17	1.6	1.6
N	NAJ			9,7	8,22		
N	HAS			7,2	6,88	0	0
N	ING			17,34	14,85		
N	OCM			14,93	13,81		
N	VIR			15,79	12,05		
N	J.MI			18,15	16,79	1,32	0,67
N	SOP			14,37	11,94	1,37	0,75
N	STE			12,4	12,4	0	0
N	M.R			12,4	11,5	0	0,77
N	CAR			7,12	8,46		
C	NOE	1/800	>120	12,09	10,66		
C	COO			<1,27	3,01		
C	VIL	1/200	51	34,93	24,56	2,89	2,47
C	BOU	1/200	>100	18,19	22,42	6,63	8,75
C	EXT	1/100	>120	19,19	26,73	8,34	8,65
C	DEV			26,29	56,82	3,34	6,04
C	GLO	1/400	>105			12,86	12,92
SR	FON	neg	neg	19,23	26,63	4,01	4,35
SR	DEC	1/400	62	10,207	7,02	4,51	8,68
SR	GRE	1/200	nd	6,8	6,84	0	
SR	DEW	neg	neg	53,42	88,97	14,23	

Tableau 4 Tableau récapitulatif des résultats sanguins et salivaires

Le traitement des salives à la NAC entraîne une diminution du signal des contrôles (voir Figure 4) : la médiane des concentrations en IgA anti-TG passe de 12.4 UA à 11.5 UA après traitement. Par contre, il y a une augmentation du signal des patients coeliaques, la médiane des concentrations passant de 18.7 UA à 23.5 UA. Les valeurs seuils (moyenne
5 des contrôles + 2DS), sont de 21 UA sans traitement et de 17 UA avec le traitement.

La sensibilité et la spécificité du test avec la TG de foie de cobaye sont donc respectivement de 30 % et 100 % sans traitement à la NAC et de 60% et 100% avec traitement.

Deux patients coeliaques n'étant pas sous régime ne sont pas détectés, même après
10 traitement des échantillons salivaires à la NAC. Pour l'un deux, les tests sériques positifs en anti-TG laissaient présager une réponse positive également sur salive. Pour ces 2 patients, par technique d'immunodiffusion, les IgA sécrétoires dans la salive non traitée n'ont pas été mise en évidence, démontrant la dégradation probable de ces échantillons salivaires. Néanmoins, également par immunodiffusion, il a été démontré que celles-ci
15 contenaient toujours de l'IgA. Sachant que ces prélèvements ont subi plusieurs cycles de congélation/décongélation, une dégradation est donc fort probable et permettrait d'expliquer les résultats négatifs de ces patients.

L'effet surprenant du prétraitement au NAC a été aussi confirmé pour le test Celikey.

L'augmentation de la médiane des contrôles après traitement était due aux résultats d'un
20 seul échantillon (MR) qui a donné une réponse légèrement plus élevée après traitement (0 U/ml et 0.77 U/ml).

Le prétraitement de la salive à la NAC a permis d'augmenter le signal des patients coeliaques puisque, sur 7 patients, 6 ont vu leur signal augmenter avec la NAC (voir Figure5). Ici, la valeur seuil (1.6 U/ml) a été calculée à partir d'un essai préliminaire réalisé
25 sur une série d'échantillons plus importante. Cette valeur seuil a été utilisée également pour les salives traitées NAC.

En conclusion, un ELISA a été mis au point pour la recherche des IgA anti-transglutaminase (TG) sur des prélèvements salivaires. Les essais réalisés en utilisant le protocole de recherche des IgA anti-TG dans le sérum, ont montré une faible
30 discrimination entre les résultats des individus contrôles et les patients coeliaques.

Un des objectifs fut donc de diminuer le signal des contrôles. L'intérêt d'une saturation par BSA ou Caséine a été évalué et l'inutilité d'une étape de saturation a été démontrée. Différentes concentrations (1ml/L et 50 ml/L) de Tween 20 ont été comparées en utilisant comme tampon de dilution soit du Tris soit du PBS. La décomplémentation s'est avérée
5 inadaptée, en effet, celle-ci provoque une chute du signal des témoins positifs.

Le pouvoir réducteur de la N-Acetyl-Cystéine (NAC) a permis de transformer les IgA sécrétoires (dimériques) en monomères et d'améliorer ainsi la réponse des patients coeliaques. Par ailleurs, cet agent rompt les liaisons IgA-mucines à l'origine des fixations non spécifiques. Après traitement à la NAC, une surprenante discrimination des deux
10 populations est observée, le signal des contrôles diminuant et la réponse des coeliaques augmentant après traitement de la salive.

L'intérêt du traitement des salives à la NAC a été aussi confirmé en utilisant le Celikey, ELISA anti-transglutaminase utilisant comme antigène de la TG recombinante humaine. La présente invention permet le dépistage de la maladie coeliaque en utilisant des
15 prélèvements salivaires.

Exemple 2 :

Confirmation de l'effet favorable du traitement par la NAC sur un plus grand nombre d'échantillons

La discrimination entre patients coeliaques et sujets contrôles en bonne santé a été
20 évaluée :

- selon que les échantillons de salive étaient ou non traités par la NAC
- en testant les salives de 15 patients coeliaques non traités et celles de 25 sujets contrôles en bonne santé
- en récoltant toutes les salives sur salivettes

25 Les Figures 7 et 8 représentent des graphes comparant le niveau d'IgA anti-TG dans des salives non traitées et traitées au N-acétyl-cystéine chez des sujets contrôles en bonne santé (Figure 7) et chez des patients coeliaques non traités (Figure 8). Les résultats illustrés aux Figures 7 et 8 montrent que l'effet de la NAC est très important sur les salives contrôles, diminuant de façon significative ($P=0.0038$) les valeurs obtenues pour les salives

contrôles. Ceci permet de diminuer la valeur choisie comme « cut-off » pour déterminer qu'un échantillon de salive contient des IgA anti-TG. En effet, si on désire obtenir pour le test une spécificité de 100 % correspondant à la totalité des salives contrôles négatives, le « cut-off » doit être fixé au-dessus de 5.1 U en l'absence de traitement par la NAC et il

5 peut être abaissé à 3.7 U lors d'un traitement par la NAC.

Sensibilité et spécificité de la détection des IgA anti-TG dans la salive pour le diagnostic de la coeliaquie non traitée

La sensibilité et la spécificité de la détection des IgA anti-TG dans la salive pour le diagnostic de la coeliaquie non traitée sont montrées au Tableau 5 et à la Figure 9. La

10 Figure 9 représente un graphe comparant le niveau d'IgA anti-TG dans des salives non traitées et traitées au N-acétyl-cystéine chez des sujets contrôles en bonne santé et chez des patients coeliaques non traités, les valeurs cut-off étant représentées par les lignes fines sur le graphe.

	NAC -	NAC +
Cutt-off	5.2 U /ml	4 U / ml
Spécificité	100 %	100 %
Sensibilité	60 %	94.12 %

15 **Tableau 5** *Sensibilité et spécificité de la détection des IgA anti-TG dans la salive pour le diagnostic de la coeliaquie non traitée*

En conclusion, le test salivaire de dosage des IgA anti-TG dans la salive développé ici offre pour le diagnostic de la coeliaquie non traitée une sensibilité comparable à celle décrite dans la littérature pour les tests sériques, et ce avec une spécificité de 100%.

Par ailleurs les résultats salivaires ont été comparés aux résultats sériques pour 16

20 personnes. Les résultats obtenus et illustrés à la Figure 10 montrent une excellente corrélation (test de corrélation de Spearman : $r = 0.68$, $p=0.0039$). Les échantillons repris dans ce graphe ont été collectés chez des patients coeliaques soit avant instauration du régime, soit au cours du traitement. Le critère d'inclusion est un délai de moins d'un mois entre la collection de la salive et celle du sérum. Il ne s'agit donc pas nécessairement des

25 mêmes échantillons que ceux repris dans le graphe de la Figure 9.

Utilité diagnostique du test développé au sein d'une population de malades

Dans le paragraphe précédent, la spécificité et la sensibilité du test développé pour le diagnostic de la coeliaquie ont été calculées en comparant les résultats obtenus chez les coeliaques à ceux obtenus chez des personnes saines, comme il est habituel de procéder.

Ici, ont été testés des échantillons de salive prélevés chez 37 patients se présentant à la
5 consultation de gastroentérologie avec des plaintes cliniques compatibles avec une coeliaquie. Chez 17 d'entre eux, le diagnostic de coeliaquie a été sérieusement évoqué et confirmé par le résultat d'une biopsie intestinale. Chez les vingt autres, le diagnostic de coeliaquie a été rejeté par le clinicien sur base d'une biopsie intestinale qui n'était pas compatible avec un diagnostic de coeliaquie.

10 Lorsqu'on compare les résultats obtenus dans ces deux groupes de patients, on obtient à nouveau une excellente discrimination sur base des taux d'IgA anti-TG détectés dans la salive. Les résultats obtenus chez les contrôles sains et chez les contrôles « pathologiques » ne sont pas significativement différents. Seuls deux patients classés comme non coeliaques étaient positifs. Les résultats de cette comparaison sont représentés à la Figure 11.

15 **Evaluation du test chez les coeliaques qui suivent un régime sans gluten**

Une fois le diagnostic de coeliaquie posé, les patients doivent suivre un régime strict sans gluten et les IgA anti-transglutaminase deviennent non détectables dans le sérum, après des temps variables selon les individus et selon la compliance au régime.

Les IgA anti-TG dans la salive de 16 patients coeliaques sous régime ont aussi été dosées.
20 Les résultats illustrés à la Figure 12 montrent que la plupart des salives sont devenues négatives si bien que ce test peut être utilisé aussi pour le monitoring (suivi) du régime sans gluten.

Revendications

1. Procédé de détection et/ou dosage d'anticorps anti-transglutaminase dans un échantillon de salive susceptible de contenir lesdits anticorps, caractérisé en ce que l'on soumet l'échantillon de salive à un prétraitement, puis en ce que l'on détecte lesdits
5 anticorps dans la salive prétraitée par une réaction immune avec de la transglutaminase dans des conditions appropriée pour la formation d'immuno-complexes avec lesdits anticorps.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le procédé comprend la collection des salives dans un dispositif d'échantillonnage puis le prétraitement qui
10 comprend la mise en contact de la salive avec un composé mucolytique.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le dispositif d'échantillonnage de salive comprend: un collecteur d'échantillon qui reçoit sélectivement un échantillon de salive; et un indicateur activé par une quantité présélectionnée de l'échantillon de salive reçu pour indiquer que la quantité de l'échantillon de fluide biologique recueilli
15 est adéquate.
4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que le dispositif d'échantillonnage est sélectionné dans le groupe comprenant : Omni-SAL[®] (Saliva Diagnostic Systems, Inc.), Salivette[®] (Sarstedt Ltd.), Orapette[®] (Trinity Biotech) and OraSure[®] (Epitope, Inc.), de préférence Omni-Sal[®].
- 20 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que le composé mucolytique est sélectionné dans le groupe comprenant la N-acétyl-cystéine, la nacystelyn, le dithiothreitol, gelsolin, thioredoxin et EDTA.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le composé mucolytique est la N-acétyl-cystéine.
- 25 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la transglutaminase est d'origine humaine, animale, synthétique ou recombinante.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la détection est effectuée dans un immuno-essai, de préférence par couplage direct ou

indirect d'un partenaire de réaction ayant une substance de marquage facilement détectable.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la détection s'effectue dans un test ELISA.
- 5 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'on met en contact les immuno-complexes formés avec un conjugué constitué par un anticorps marqué dirigé contre lesdits anticorps, dans des conditions appropriées pour la formation d'immuno-complexes marqués, puis on détecte et on quantifie les immuno-complexes marqués.
- 10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le conjugué est un anticorps anti-immunoglobuline marqué à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase, puis on détecte et on quantifie la formation d'immuno-complexes marqués par colorimétrie ou fluorimétrie.
12. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour la
15 détection de maladies induites par le gluten.
13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la maladie à détecter est la maladie coeliaque.
14. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour le monitoring d'un régime sans gluten.
- 20 15. Procédé de diagnostic ou de suivi thérapeutique de la maladie coeliaque, caractérisé en ce que on détecte des anticorps anti-transglutaminase dans un échantillon de salive susceptible de contenir lesdits anticorps, caractérisé en ce que l'on soumet l'échantillon de salive à un prétraitement, puis en ce que l'on détecte lesdits anticorps dans la salive prétraitée par une réaction immune avec de la transglutaminase dans des conditions
25 appropriée pour la formation d'immuno-complexes avec lesdits anticorps.
16. Procédé de diagnostic ou de contrôle selon la revendication 15, caractérisé en ce que le procédé comprend la collection de la salive dans un dispositif d'échantillonnage puis le prétraitement qui comprend la mise en contact de la salive avec un composé mucolytique.

17. Procédé de diagnostic ou de contrôle selon la revendication 16, caractérisé en ce que le dispositif d'échantillonnage de salive comprend: un collecteur d'échantillon qui reçoit sélectivement un échantillon de salive; et un indicateur activé par une quantité présélectionnée de l'échantillon de salive reçu pour indiquer que la quantité de l'échantillon de fluide biologique recueilli est adéquate.
18. Procédé de diagnostic ou de contrôle selon la revendication 17, caractérisé en ce que le dispositif d'échantillonnage est sélectionné dans le groupe comprenant : Omni-SAL[®] (Saliva Diagnostic Systems, Inc.), Salivette[®] (Sarstedt Ltd.), Orapette[®] (Trinity Biotech) and OraSure[®] (Epitope, Inc.), de préférence Omni-Sal[®].
19. Procédé de diagnostic ou de contrôle selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que le composé mucolytique est sélectionné dans le groupe comprenant la N-acétyl-cystéine, la nacystelyn, le dithiothreitol, gelsolin, thioredoxin et EDTA.
20. Procédé de diagnostic ou de contrôle selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que le composé mucolytique est la N-acétyl-cystéine.
21. Kit diagnostique pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de la maladie coeliaque selon l'une quelconque des revendications 15 à 20.

1/6

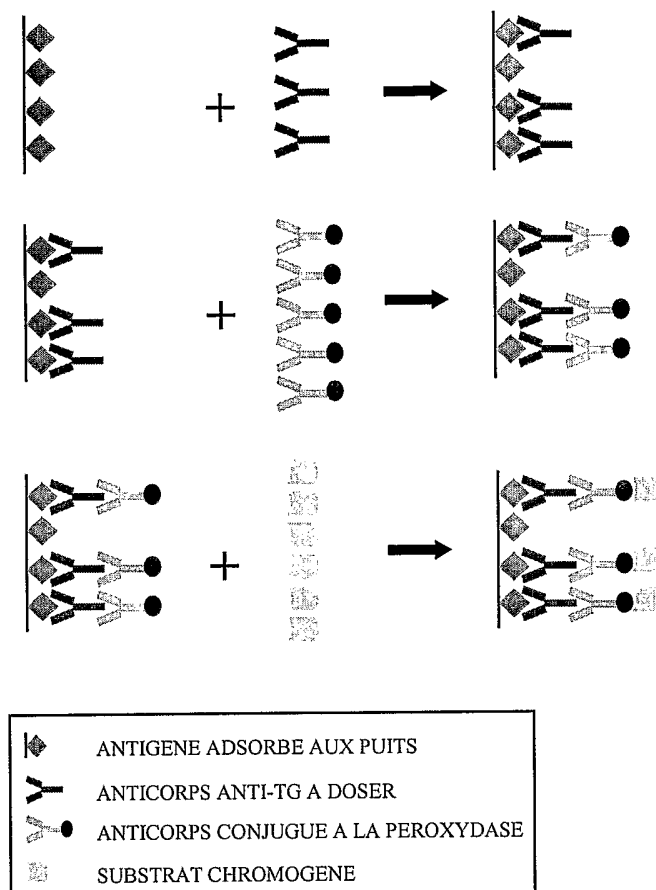


Fig. 1

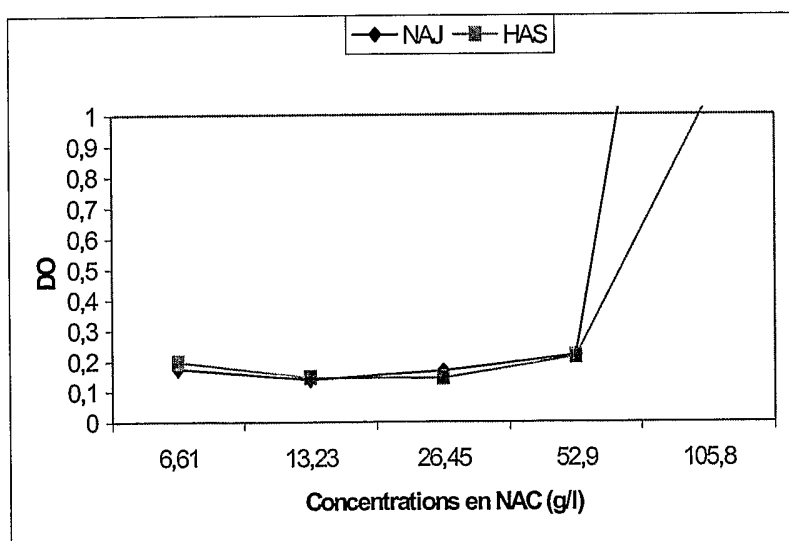


Fig. 2

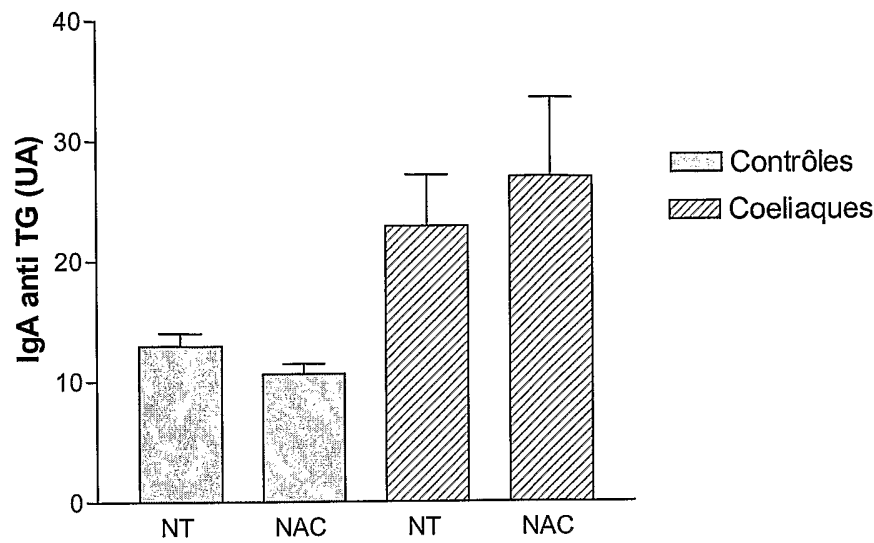


Fig. 3

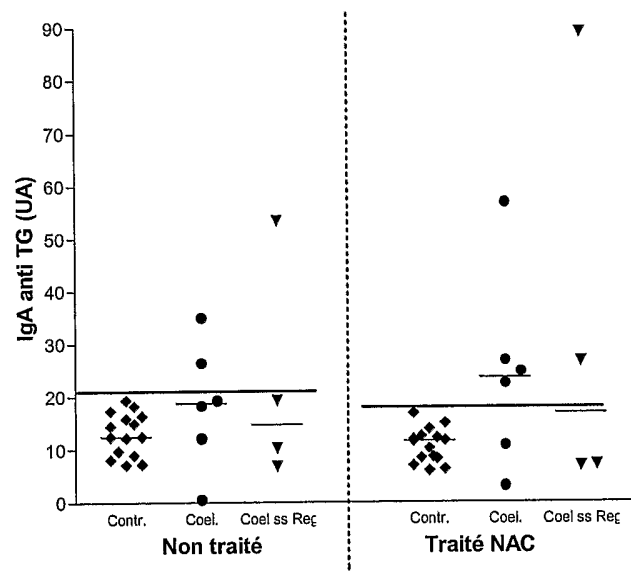


Fig. 4

3/6

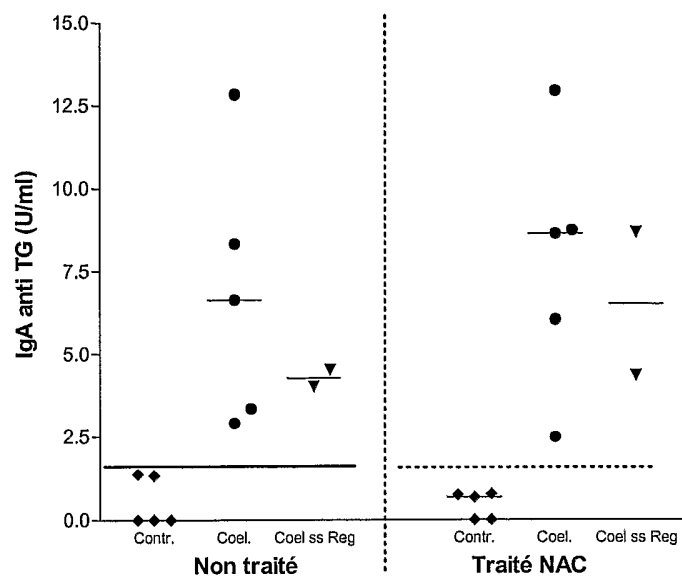


Fig. 5

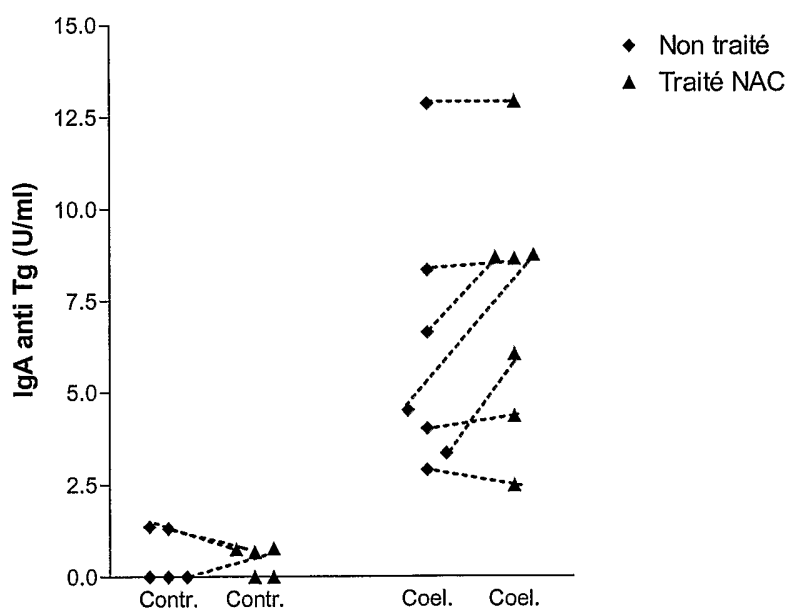


Fig. 6

4/6

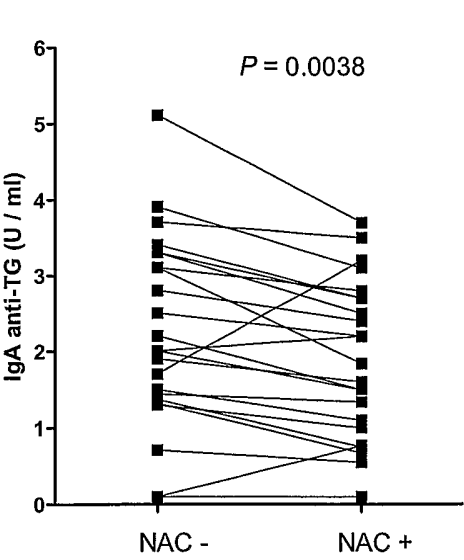


Fig. 7

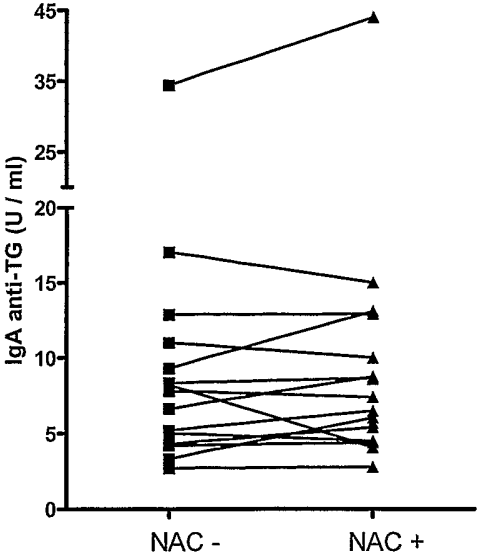


Fig. 8

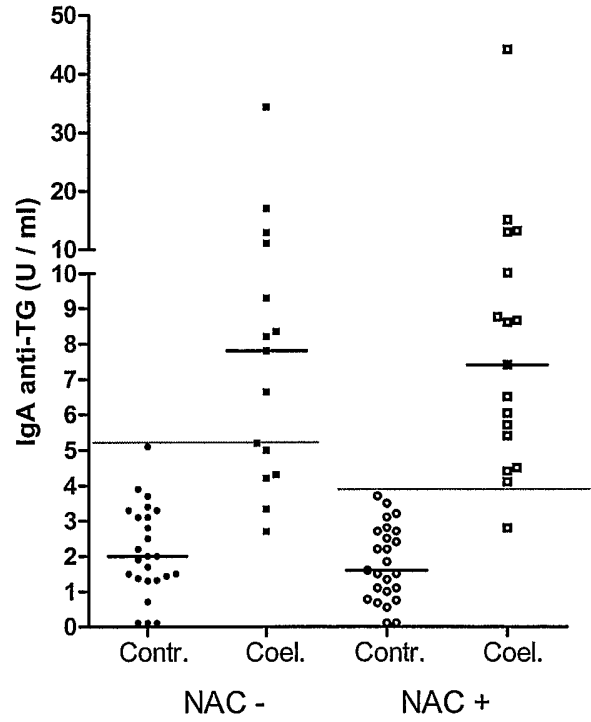


Fig. 9

5/6

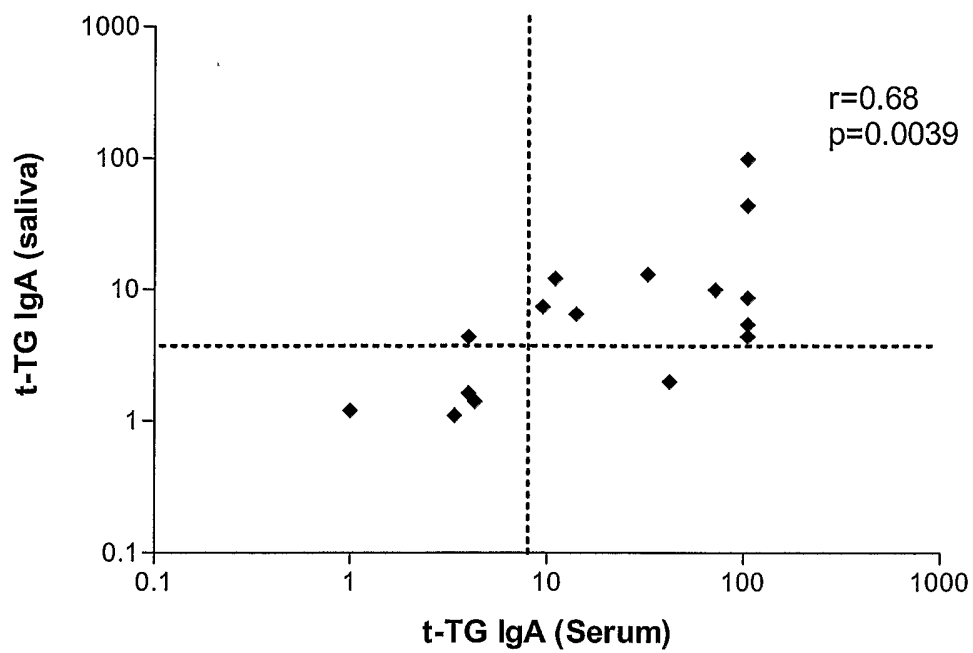


Fig. 10

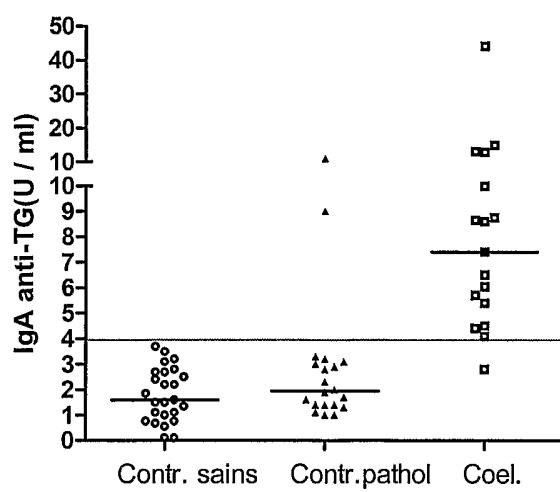


Fig. 11

6/6

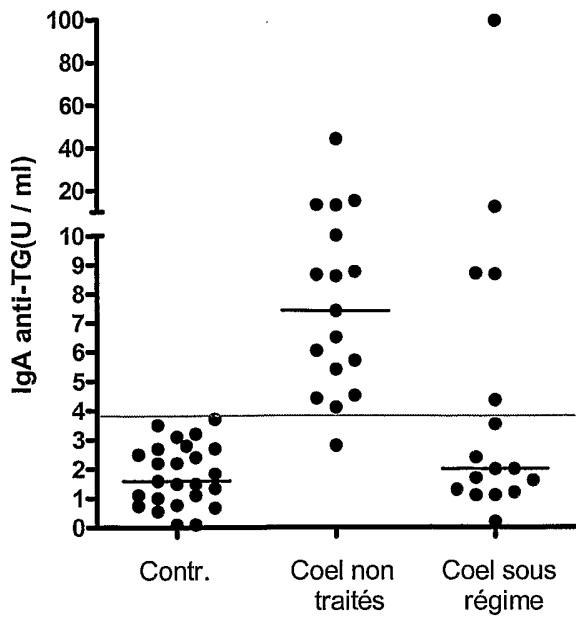


Fig. 12