

# DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE DE LA MALADIE CŒLIAQUE : COMPARAISON DE DEUX KITS DE DOSAGE DES AUTO-ANTICORPS.

**S.S. SALAH \*, M. BENIDIR \*, K. MEKDAM , R. KESSOUS , S. KEBBAB , S. BOUCIF , N. ABDELLAOUI , S. ZOUAOUI , N. ATTAL**

Département d'Immunologie, Institut Pasteur d'Algérie, Alger.

\* : Co-auteurs premiers.

## Résumé :

### Introduction et objectif :

Dans le diagnostic de la maladie cœliaque (MC), la sérologie passe par la recherche des anticorps (Ac) dont les : anti-gliadine (AGA), anti-transglutaminase tissulaire (tTG), et anti-peptides de gliadine désamidée (DGP). Elle utilise diverses techniques dont l'ELISA et l'immunofluorimétrie en flux (IFF). L'objectif de notre travail est d'évaluer la pertinence du dosage des Ac anti-tTG et anti-DGP par technique ELISA et IFF, dans le diagnostic et le suivi de la MC et d'établir leurs valeurs diagnostiques.

### Matériel et méthodes :

Nous avons réalisé une sérothèque à partir de 409 sérums qui ont été répartis en trois groupes : I (MC confirmée : 76 cas) ; II (suspicion de MC : 230 cas) et III (population témoin : 103 sujets sains) et dans lesquels les Ac spécifiques de la MC ont été recherchés par 2 tests : ELISA (CeliCheck<sup>®</sup>) et IFF (FIDIS<sup>™</sup>Celiac DPG).

### Résultats :

L'analyse des résultats révèle une sensibilité de l'IFF qui diffère selon la combinaison des Ac : 99% pour 3 Ac et 97% pour 2 Ac. Quant à la spécificité, elle est de 100% concernant les IgA anti-tTG et anti-DGP et de 95% pour les AGA. Par ailleurs, l'étude de la corrélation entre la production des Ac détectés par l'ELISA (anti-tTG/DGP) et les 3 Ac détectés par l'IFF, montre une corrélation positive pour les IgA anti-DGP ( $r = 0,61$ ) ; IgA anti-tTG ( $r = 0,59$ ) et les AGA ( $r = 0,55$ ).

### Discussion :

Les valeurs diagnostiques de l'IFF sont supérieures aux données publiées, notamment, par l'équipe de Rashtak et al (2008), de même que le test ELISA ceci est peut-être dû à la détection exclusive par ce dernier test des Ac anti-néo-épitope (complexe tTG-DGP). Par ailleurs, la concordance globale entre les 2 tests rejoint les données de la littérature.

### Conclusion :

Le test ELISA CeliCheck<sup>®</sup> offre un avantage certain en détectant les Ac anti-néo-épitope et constitue un excellent test de screening et de suivi de la MC, au même titre que l'IFF.

**Mots clés : Maladie cœliaque, gluten, néo-épitope, ELISA CeliCheck<sup>®</sup>, IFF FIDIS<sup>™</sup> Celiac DPG.**

## Summary :

### Introduction and objective:

In the diagnosis of celiac disease (CD), serology involves detection of antibodies (Ab) including anti-gliadin (AGA), anti-tissue transglutaminase (tTG), and anti-deamidated gliadin peptides (DGP). It uses a variety of techniques including ELISA and immunofluorimetry (IF). The aim of our work is to evaluate anti-tTG and anti-DGP measurement by ELISA and IF in CD diagnosis and monitoring and to establish their diagnostic values.

### Material and methods:

We realized a serotheque with 409 sera divided into three groups: I (confirmed CD: 76 cases); II (suspected CD: 230 cases) and III (control population: 103 healthy individuals) and in which CD-specific Abs were measured by ELISA (CeliCheck<sup>®</sup>) and IF (FIDIS<sup>™</sup>Celiac DPG).

### Results:

Results analysis reveals a sensitivity of IF which differs according to Ab combination: 99% for 3 Abs and 97% for 2 Abs. As for specificity, it is about 100% for anti-tTG and anti-DGP IgA and 95% for AGA. Furthermore, correlation between Ab production detected by ELISA (anti-tTG / DGP) and the 3 Abs detected by the IF shows a positive correlation with anti-DGP IgA ( $r = 0,61$ ); IgA anti-tTG ( $r = 0.59$ ) and AGA ( $r = 0.55$ ).

### Discussion:

IF diagnostic values are superior to published data, in particular those published by Rashtak et al. (2008), as well as ELISA test, this may be due to the exclusive detection by this test (ELISA) of anti neo-epitope Ab (tTG-DGP complex). Moreover, overall agreement between the two tests corresponds to literature data.

### Conclusion:

The CeliCheck<sup>®</sup> ELISA assay offers a definite advantage in detecting anti-neoepitope Abs and is an excellent screening and monitoring test of CD as well as IF.

**Key words: Celiac disease, gluten, neoepitope, ELISA CeliCheck<sup>®</sup>, IF FIDIS<sup>™</sup> Celiac DPG.**

## I-Introduction

La Maladie Coéliqua (MC) est une entéropathie auto-immune secondaire à l'ingestion de gluten, chez des sujets prédisposés génétiquement (HLA-DQ2 ou DQ8)<sup>(1)</sup>, touchant aussi bien l'enfant que l'adulte et d'expression clinique très polymorphe. Son diagnostic repose sur des arguments, à la fois, cliniques, biologiques et histopathologiques, ces derniers en constituent le "Gold Standard", outil diagnostique incontournable, jusqu'à présent, malgré leur caractère invasif. En effet, le diagnostic positif repose sur la mise en évidence d'anomalies histopathologiques sur des fragments de biopsies duodéno-jéjunales et sur la rémission clinique suite à l'éviction du Gluten (Régime sans Gluten). Toujours est-il, la sérologie, et donc, la recherche des anticorps spécifiques de la MC prend une place de plus en plus importante dans le dépistage et le diagnostic positif tout en étant non invasive et sans contrainte pour le patient. Par ailleurs, ces anticorps sont directement impliqués dans la physiopathologie, responsables, entre autres, de la destruction des entérocytes dont l'aboutissement est l'apparition du syndrome de malabsorption avec des manifestations digestives et extra-digestives. Ces anticorps sont dirigés contre : la Transglutaminase tissulaire (tTG, tissular

Transglutaminase), la Gliadine et le peptide de Gliadine désamidée (DGP, deamidated gliadin peptide). Ils sont recherchés par diverses méthodes dont la technique immunoenzymatique (ELISA), l'immunofluorimétrie en flux (IFF), l'immuno-dot et l'immuno-blot. Cependant, les valeurs diagnostiques de ces techniques sont très controversées, en matière de diagnostic et de suivi de la MC, obligeant les cliniciens à prescrire plusieurs examens simultanément d'où une perte de temps considérable et coût élevé. En vue de clarifier cela, nous nous sommes fixés pour objectif d'évaluer les performances diagnostiques de 2 tests de dosage des anticorps (Ac) spécifiques de la MC : le test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) et le test d'IFF (FIDIS™ Celiac DPG).

## II- Matériel et Méthodes

### II.1- Patients

Il s'agit d'une étude rétrospective de type "cas-témoins" réalisée au sein du laboratoire d'auto-immunité du département d'Immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie et ayant porté sur 409 cas subdivisés en 3 groupes (Tableau 1).

	Groupe I MC confirmée	Groupe II Suspicion de MC	Groupe III Sujets sains
Nombre	76	230	103
Âge [an]	24± 14	21± 17	36± 10
Âges extrêmes [an]	1 – 59	1 – 76	18 – 60
Sexe Ratio (H : F)	1 : 3	1 : 2	4 : 1
Durée d'évolution [an]	5,6±5,8	2,8 ±3,8	-
* Groupe I : 26 enfants + 50 adultes ; Groupe II : 116 enfants + 114 adultes			
** Groupe I : 69 patients sous RSG vs. 7 patients sous régime libre			

Tableau 1 : Caractéristiques de la population étudiée.

### II.2- Méthodes

#### II. 2. 1- Recherche des IgA/IgG anti-tTG/DGP par la technique ELISA

Réalisée par une technique immunoenzymatique quantitative de type ELISA simple sandwich (Test AESKULISA® CeliCheck New Generation). L'antigène utilisé est un complexe protéique recombinant fait de la tTG (Néo-épitope) réticulée à un peptide de gliadine désamidée (DGP). Cet antigène est fixé au fond des puits d'une plaque ELISA. Les IgA/IgG anti-tTG/DGP, présents dans le sérum des patients, se lient au complexe protéique fixé. Ensuite, un conjugué enzymatique anti-IgA/IgG humaine est rajouté dans chaque puits et se lie aux IgA/IgG anti-DGP déjà fixées et l'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition du substrat chromogène de l'enzyme utilisée

comme marqueur et, enfin, après arrêt de la réaction, la densité optique de la coloration développée est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 450 nm. Le seuil de positivité est de 24 UA/ml.

#### II. 2. 2- Recherche des IgA anti-tTG, IgA anti-DGP et IgA AGA par Immunofluorimétrie en flux

Cette méthode permet l'identification quantitative des Ac anti-tTG, IgA anti-DGP et IgA AGA sur supports particuliers utilisant un système de détection par cytométrie de flux. Elle permet la recherche simultanée de 3 Ac, d'isotype IgA, dirigés contre 3 peptides : tTG, DGP et la gliadine (Test FIDIS™ Celiac DPG, Theradiag). Elle repose sur l'utilisation de microsphères



(billes) de polystyrène de 5,6 µm de diamètre qui sont colorées par l'incorporation de deux marqueurs fluorescents rouge et orange en quantités variables, générant ainsi 100 types de billes différentes, chacune caractérisée par un code couleur. Sur chaque type de bille, un antigène différent (tTG, DGP et gliadine) est fixé de façon covalente. Le sérum des patients est mis en présence d'un mélange de billes, en vue de la détection éventuelle des IgA anti-tTG, IgA anti-DGP et IgA AGA. Ensuite, un conjugué fluorescent anti-IgA humaines marqué à la phycoérythrine, permet de révéler et de quantifier les IgA anti-tTG, IgA anti-DGP et IgA AGA. À l'étape finale, chaque bille passe dans le faisceau de deux lasers d'un cytomètre, appelé également fluorimètre en flux.

- Le laser rouge (635 nm) identifie le code couleur de la bille, donc, l'antigène par sa fluorescence intrinsèque.
  - Le laser vert (532 nm) mesure la quantité de conjugué, donc, d'IgA anti-tTG, IgA anti-DGP et IgA AGA fixées à la surface de la bille.
- Le seuil de positivité est de 15 UA/ml.

### II. 2. 3- Tests statistiques

Afin de déterminer les performances diagnostiques des 2 tests "ELISA et IFF", la sensibilité et la spécificité ont été calculées de même que le recours à la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) qui permet d'évaluer les performances diagnostiques des tests grâce au calcul de l'aire sous la courbe (AUC, Area Under Curve). Les taux en Ac sont exprimés par la Moyenne ± 1 DS (Déviation standard) et ont été comparés

grâce au test de Student et la valeur du p (p-value) a été calculée, la différence étant statistiquement significative quand la valeur du p ≤ 0,05. Quant à l'étude de la corrélation entre la production des Ac spécifiques de la MC, elle a été effectuée grâce au calcul du coefficient de corrélation de Spearman (rho), une corrélation étant positive quand le rho a une valeur allant de 0 à 1 (faible entre 0 - 0,5 et forte entre 0,5 - 1). Les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel : GraphPad Prism<sup>®</sup> version 5.01.

### III-Résultats

Dans ce qui va suivre, les résultats que nous avons obtenus par l'IFF (FIDIS<sup>™</sup> Celiac DPG) sont considérés :

- Positifs : si la recherche d'un Ac de la combinaison des 3 Ac (IgA anti-DGP, anti-tTG et AGA) est positive ;
- Négatif : si la recherche des 3 Ac est négative.

Les résultats douteux sont considérés négatifs, pour les 2 tests (ELISA et IFF).

#### III. 1- Comparaison des taux des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et ceux des IgA anti-tTG, anti-DGP et AGA (IFF) entre patients cœliaques et sujets sains

Grâce au test de Student, les taux moyens de production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et de celui des IgA anti-tTG, anti-DGP et AGA (IFF) ont été comparés entre les patients cœliaques (MC confirmée) et les sujets sains.

Il en ressort que les patients cœliaques produisent, de manière

	Patients Cœliaques	Sujets Sains	(p)
IgA/IgG anti-tTG/DGP [UA/ml]	310 ± 41	8 ± 1	< 0,0001
IgA anti-tTG [UA/ml]	53 ± 8	9 ± 1	< 0,0001
IgA anti-DGP [UA/ml]	113 ± 21	9 ± 1	< 0,0001
IgA AGA [UA/ml]	109 ± 32	11 ± 1	0,0002

**Tableau 2 :** Comparaison des taux des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et ceux des IgA anti-tTG, anti-DGP et AGA (IFF) entre patients cœliaques et sujets sains

statistiquement significative, plus d'Ac spécifiques de la MC que les sujets sains (Tableau 2).

#### III. 2- Concordance entre les résultats du dosage des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celui des IgA anti-tTG, anti-DGP et AGA (IFF)

D'abord nous avons calculé la concordance globale entre les résultats l'ELISA (AESKULISA<sup>®</sup> CeliCheck New Generation) vs. IFF (FIDIS<sup>™</sup> Celiac DPG) selon la combinaison en Ac et qui était de :

- 90% pour la combinaison des 3 Ac "IgA anti-tTG + IgA anti-

DGP + IgA AGA";

- 91% pour la combinaison de 2 Ac "IgA anti-tTG + IgA anti-DGP" (Tableau 3).

Nous avons remarqué que la combinaison des "IgA anti-tTG + IgA anti-DGP", dosés par l'IFF, est relativement meilleure, en matière de concordance avec les résultats de l'ELISA, que la combinaison de ces 2 Ac aux IgA AGA (91% vs. 90%).

Par la suite, nous avons pris séparément chaque Ac, dosé par l'IFF, et nous avons calculé la concordance avec le dosage des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA). Ainsi, la concordance globale

**concernant :**

- Les IgA anti-tTG est de 78%;
- Les IgA anti-DGP est de 86%;
- Les IgA AGA est de 71% (Tableau 3).

Ces résultats montrent que la concordance du dosage des IgA anti-DGP (IFF) avec celui des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) est meilleure que celle des IgA anti-tTG (86% vs. 78%) et des IgA AGA (86% vs. 71%).

IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA)			
<b>Combinaison des 3 anticorps (IgA anti-tTG + IgA anti-DGP + IgA AGA)</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 90%</b>
	173	21	
	19	196	
<b>Combinaison de 2 anticorps (IgA anti-tTG + IgA anti-DGP)</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 91%</b>
	168	13	
	24	204	
<b>IgA anti-tTg</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 78%</b>
	105	3	
	88	213	
<b>IgA anti-DGP</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 86%</b>
	147	12	
	45	205	
<b>IgA anti-gliadine (AGA)</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 71%</b>
	85	13	
	107	204	

**Tableau 4 :** Valeurs diagnostiques du test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) et de l'IFF (FIDIS™ Celiac DPG)

**Évaluation des performances diagnostiques du test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) et de l'IFF (FIDIS™ Celiac DPG)**

Afin d'évaluer les valeurs diagnostiques des 2 tests "AESKULISA® CeliCheck New Generation" et "FIDIS™ Celiac DPG", en se basant sur les recommandations de l'ESPGHAN 2012<sup>(1)</sup> concernant les critères diagnostiques de la MC, nous avons choisi 2 critères d'inclusion, sachant qu'un seul critère soit suffisant pour considérer un patient comme étant atteint de la MC, et qui sont :

1. IgA anti-tTG : élévation > 10 fois la norme. Cette valeur numérique dépend de la méthode d'analyse et de l'équipement utilisé. Le cut-off recommandé est > 10 UA/ml (UA : Unités Arbitraires) et fait actuellement l'objet d'une étude européenne multicentrique.
2. IgA anti-endomysium (EMA) : pathologiques. Elles sont déterminées sur un 2<sup>ème</sup> échantillon sanguin, afin d'éviter d'éventuelles confusions de tubes.

Ces deux critères sont applicables à 71 patients cœliaques (71/76).



IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA)			
<b>Combinaison des 3 anticorps (IgA anti-tTG + IgA anti-DGP + IgA AGA)</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 90%</b>
<b>Positif</b>	173	21	
<b>Négatif</b>	19	196	
<b>Combinaison de 2 anticorps (IgA anti-tTG + IgA anti-DGP)</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 91%</b>
<b>Positif</b>	168	13	
<b>Négatif</b>	24	204	
<b>IgA anti-tTG</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 78%</b>
<b>Positif</b>	105	3	
<b>Négatif</b>	88	213	
<b>IgA anti-DGP</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 86%</b>
<b>Positif</b>	147	12	
<b>Négatif</b>	45	205	
<b>IgA anti-gliadine (AGA)</b>			
<b>FIDIS™ Celiac DPG (IFF)</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Concordance globale 71%</b>
<b>Positif</b>	85	13	
<b>Négatif</b>	107	204	

**Tableau 4 :** Valeurs diagnostiques du test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) et de l'IFF (FIDIS™ Celiac DPG)

Nous avons évalué les valeurs diagnostiques des 2 tests "ELISA et IFF", dans la population étudiée, et avons obtenu en matière de :

**-Sensibilité:**

- Le test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation), dosant les IgA/IgG anti-tTG/DGP, est le plus sensible en étant positifs dans 100% des cas ;
- Le test IFF (FIDIS™ Celiac DPG), dosant les IgA anti-tTG, anti-DGP et AGA, voit sa sensibilité décroître selon la combinaison en Ac. Ainsi, la sensibilité est de :
  - 99% pour la combinaison "IgA anti-tTG + IgA anti-DGP + IgA AGA" ;
  - 97% pour la combinaison "IgA anti-tTG + IgA anti-DGP" ;
  - 89% pour les IgA anti-DGP ;
  - 78% pour les IgA anti-tTG ;
  - 74% pour les IgA AGA.

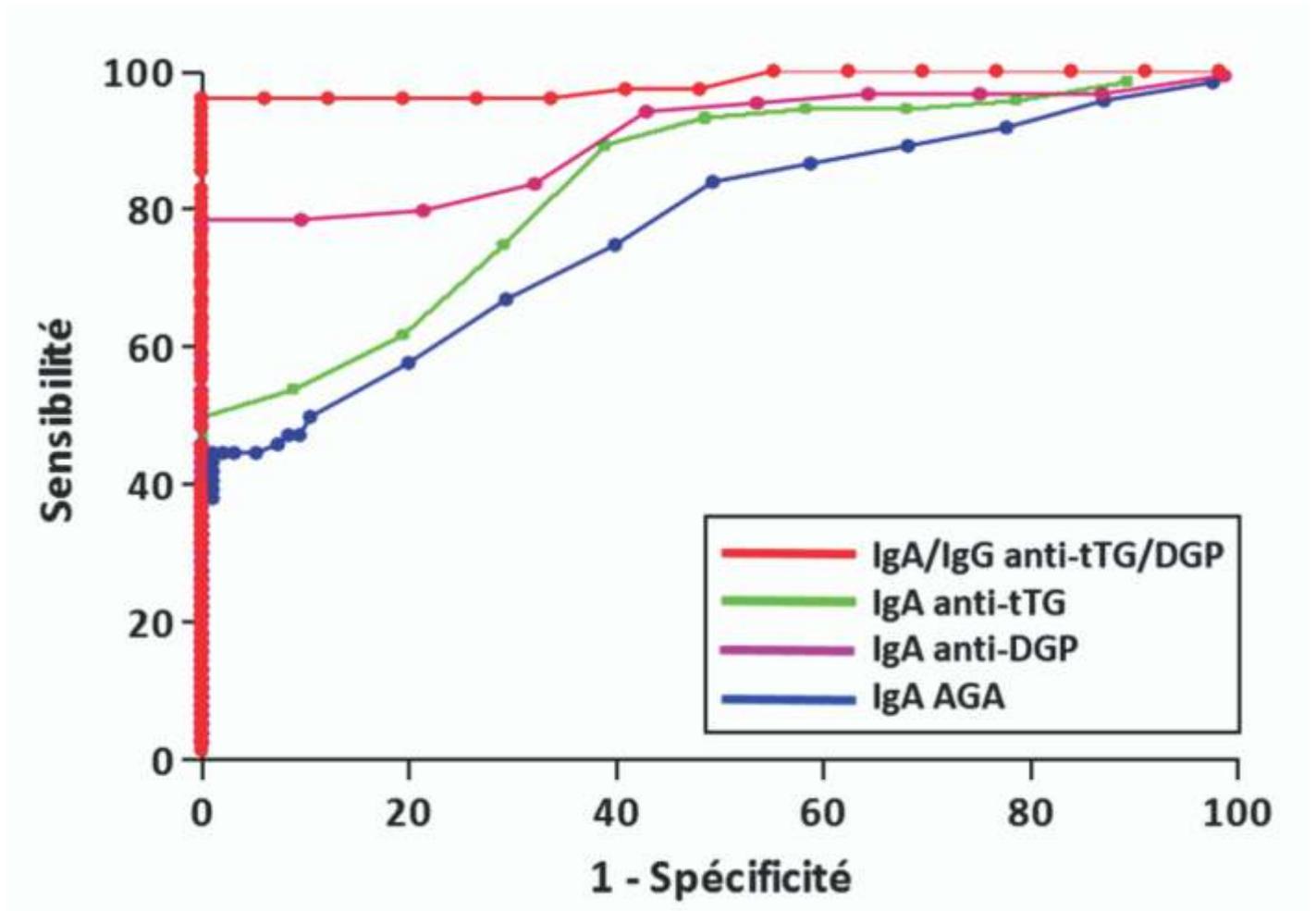
**-Spécificité :**

- Le test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) est le plus spécifique, négatif chez tous les sujets sains et donc avec une spécificité de 100% ;
- Le test IFF (FIDIS™ Celiac DPG) voit sa spécificité varier en fonction de l'Ac considéré. Ainsi, elle est de :
  - 100% pour les IgA anti-DGP ;
  - 100% pour les IgA anti-tTG ;
  - 95% pour les IgA AGA (Tableau 4).

L'analyse de la courbe ROC montre que le test ELISA(AESKULISA® CeliCheck New Generation)possède de bien meilleures performances diagnostiques (sensibilité et spécificité) que le test IFF(FIDIS™ Celiac DPG). Néanmoins, l'AUC qui se rapproche le plus de celle des IgA/IgG anti-tTG/DGP (0,982) est celle des IgA anti-DGP (0,906) suivie par celle des IgA anti-tTG (0,838)(Tableau 5 ; Figure 1).

	AUC	P	IC 95%
IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA)	0,982	< 0,0001	0,962 – 1
IgA anti-tTG (IFF)	0,838	< 0,0001	0,778 – 0,897
IgA anti-DGP (IFF)	0,906	< 0,0001	0,856 – 0,955
IgA AGA (IFF)	0,776	< 0,0001	0,705 – 0,846

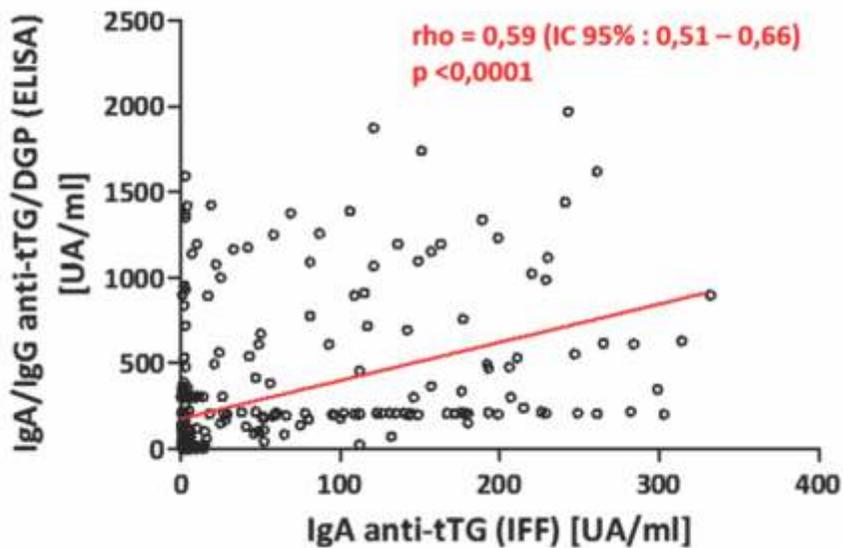
**Tableau 5:** Calcul des AUC pour l'évaluation des performances diagnostiques des tests ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) vs. IFF (FIDIS™ Celiac DPG).



**Figure 1 :** Courbe ROC de la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et de celui des IgA anti-tTG, anti-DGP et AGA (IFF).

### III. 4- Étude de la corrélation entre les résultats du test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) et le test IFF (FIDIS™ Celiac DPG)

#### III. 4. 1- Étude de la corrélation entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA anti-tTG (IFF)



os résultats montrent une corrélation positive entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA anti-tTG (IFF) : rho = 0,59 ; IC 95% : 0,51 – 0,66 ; p < 0001 (Figure 2).

Figure 2 : Corrélation entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA anti-tTG (IFF).

### III. 4. 2- Étude de la corrélation entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA anti-DGP (IFF)

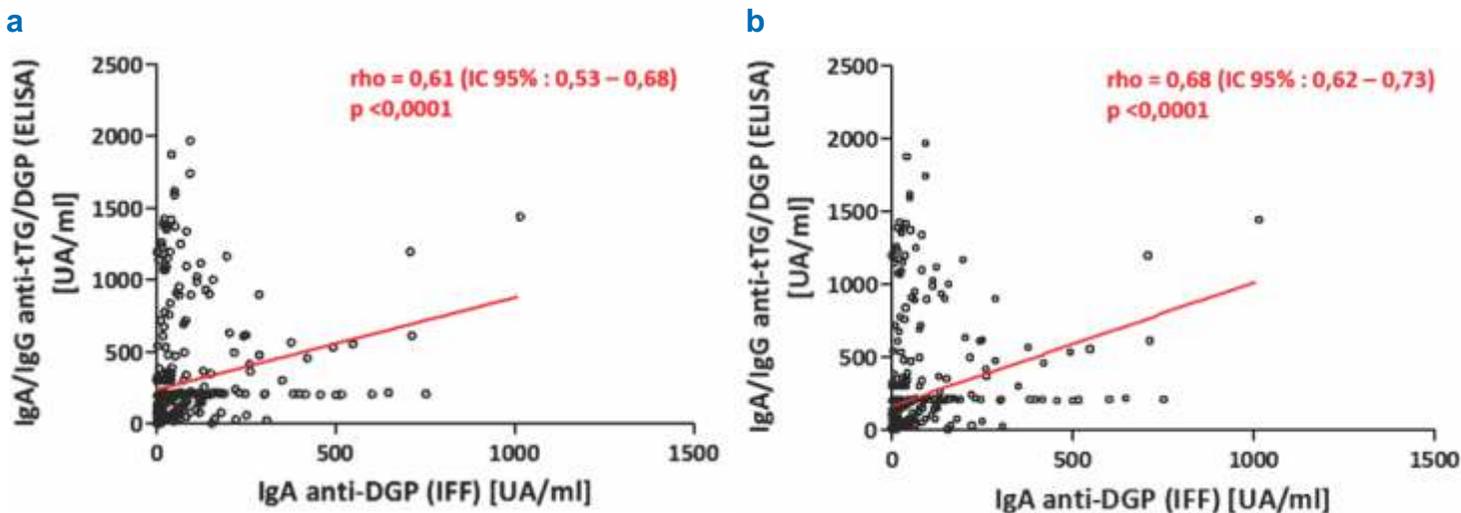
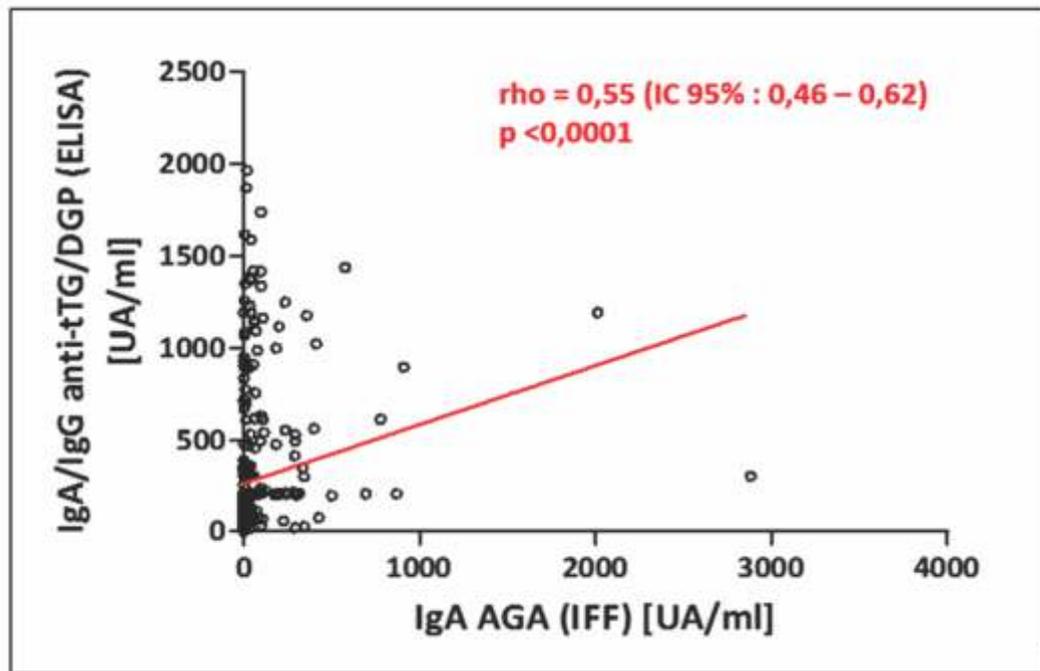


Figure 3 : Corrélation entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA anti-DGP (IFF). a- corrélation calculée chez les "Patients" ; b- Corrélation calculée chez les "Patients + Sujets sains".

Nos résultats montrent une corrélation positive entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA anti-DGP (IFF), que cette corrélation soit calculée chez les patients seuls ou chez les patients et les sujets sains :

a- Patients : rho = 0,61 ; IC 95% : 0,53 – 0,68 ; p < 0,0001 (Figure 3-a).

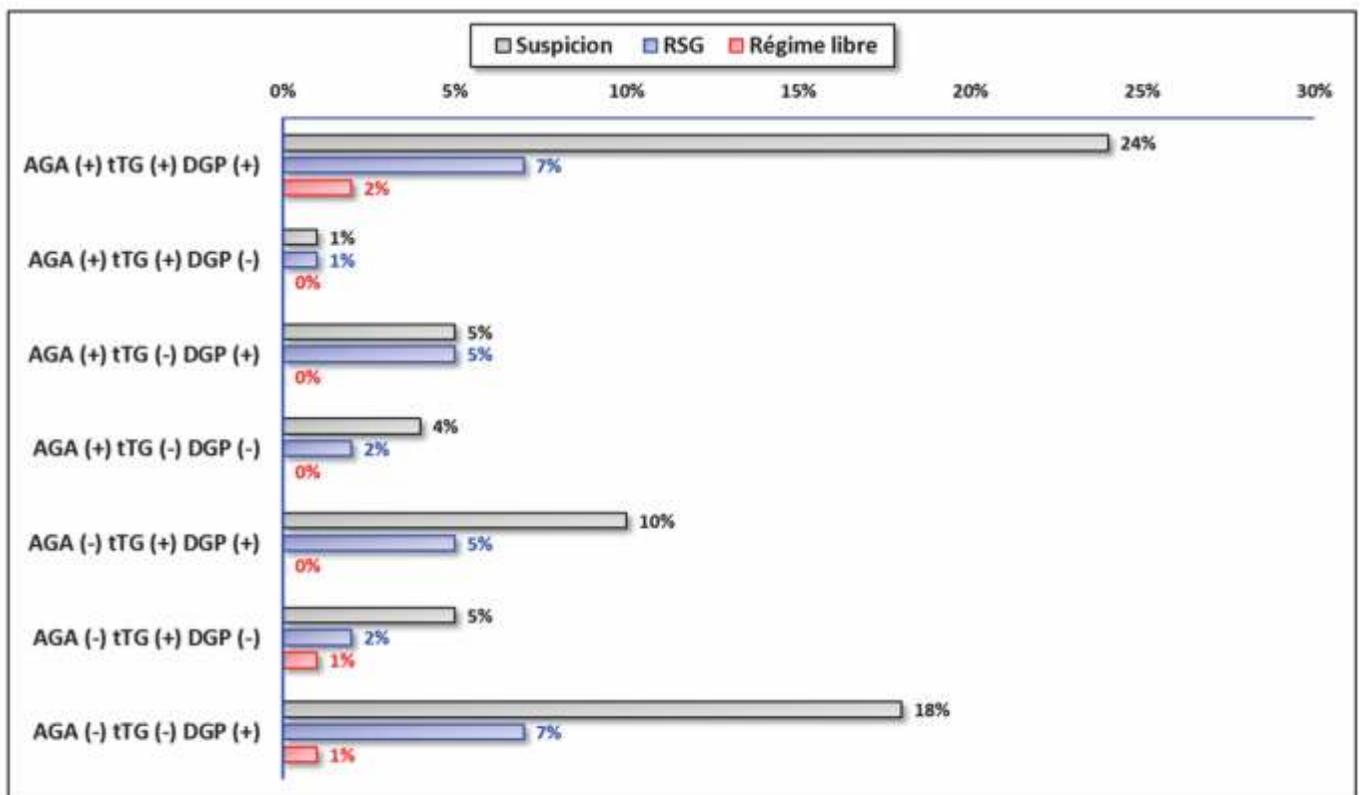
b- Patients + Sujets sains : rho = 0,68 ; IC 95% : 0,62 – 0,73 ; p < 0,0001 (Figure 3-b).



**Figure 4 :** Corrélation entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA AGA (IFF).

Nos résultats montrent une corrélation positive entre la production des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et celle des IgA AGA (IFF) : rho = 0,55 ; IC 95% : 0,46 – 0,62 ; p < 0,0001 (Figure 4).

**III. 5- Étude des différentes combinaisons d'anticorps détectés par l'IFF (FIDIS™ Celiac DPG) dans la population malade**

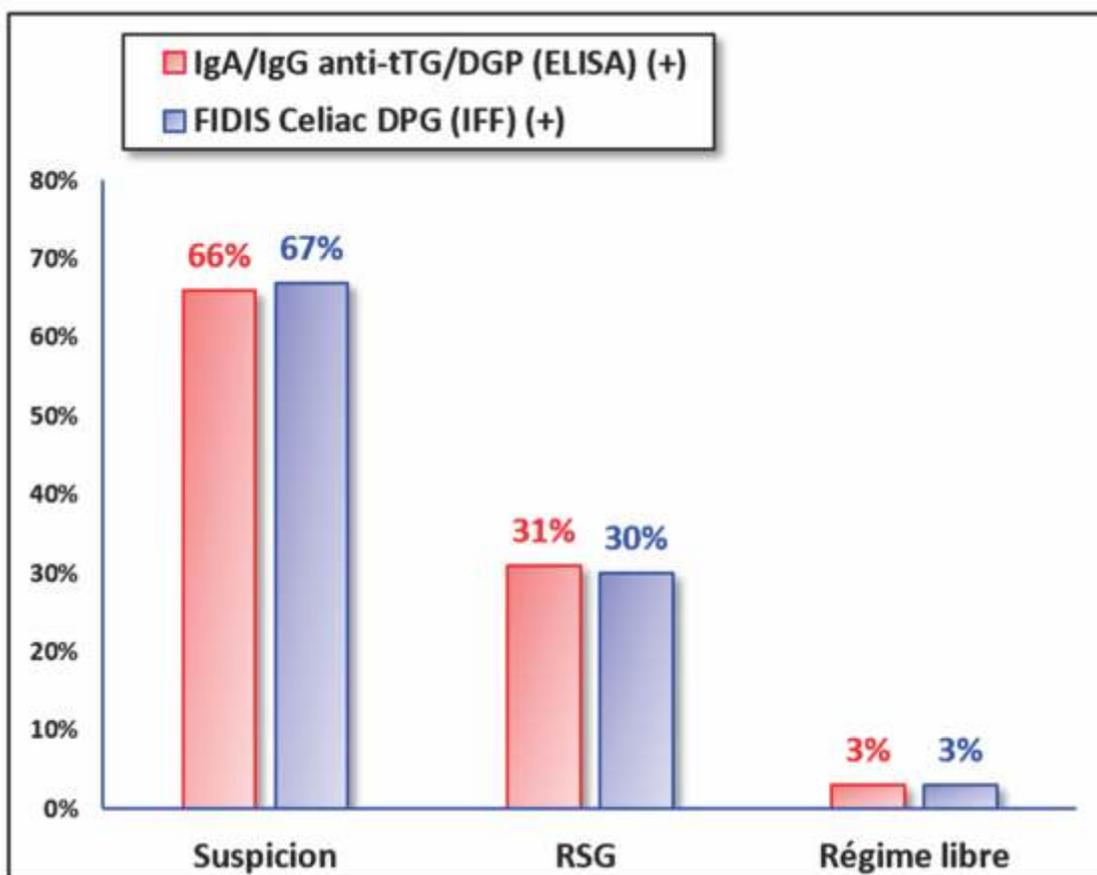


**Figure 5 :** Combinaisons d'anticorps détectés par l'IFF (FIDIS™ Celiac DPG) dans la population malade.



Nous avons comparé les différentes combinaisons en Ac chez les patients coeliaques selon qu'ils soient sous RSG, sous régime libre ou tout simplement présentant des signes cliniques évocateurs de la MC (suspicion de MC). Les résultats obtenus montrent clairement la supériorité de la recherche combinée des 3 Ac (IgA anti-tTG + IgA anti-DGP + IgA AGA) en cas de suspicion de MC permettant un dépistage précoce de la maladie (24% des cas). De la même manière, la recherche des IgA anti-DGP pris seuls, cette fois, prend une place incontournable dans le dépistage de la MC. En effet, ces Ac sont produits chez 18% des patients présentant une "suspicion de MC" (Figure 5). Quant à la combinaison des "IgA anti-tTG + IgA anti-DGP", bien que produite de façon moindre dans les cas de suspicion de MC, garde une place importante dans le dépistage de la MC. Ainsi, dans le dépistage de la MC, l'idéal serait de chercher les 3 Ac combinés sinon les IgA anti-DGP.

### III. 6- Comparaison globale des résultats du dosage par le test ELISA et le test IFF



**Figure 6 :** Comparaison globale des résultats du dosage des IgA/IgG anti-tTG/DGP (ELISA) et des anticorps par le test FIDIS™Celiac DPG (IFF).

À la comparaison globale des résultats obtenus par le test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) vs. IFF (FIDIS™Celiac DPG), en fonction du régime alimentaire des patients (RSG et régime libre) et dans le cas de suspicion de la MC, la recherche des Ac par l'IFF (FIDIS™Celiac DPG) est légèrement plus avantageuse que celle effectuée par le test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) en cas de suspicion de MC : 67% vs. 66%, sans qu'il y ait de différence statistiquement significative (Figure 6). Toutefois, en cas de RSG, le test ELISA l'emporte sur l'IFF (31% vs. 30%). Enfin, chez les patients coeliaques suivant un régime libre, les deux tests se valent (3% vs. 3%).

### IV-Discussion

#### IV. 1- Concordance entre les résultats des tests ELISA et IFF dans la recherche des anticorps spécifiques de la Maladie Cœliaque

Nos résultats ont montré de très bonnes concordances entre les 2 tests (ELISA et IFF), en accord avec les concordances décrites dans l'étude de Rashtak et al (88%)<sup>(2)</sup>. Les cas discordants pourraient s'expliquer par le fait que le test ELISA détecte, en même temps, les deux isotypes IgA et IgG en plus

de la détection concomitante des Ac anti-néo-épitope de la tTG, détail pour lequel le test IFF fait défaut. De plus, le test IFF détecte les IgA AGA qui ne sont pas détectées par le test ELISA.

Plusieurs études avaient traité la question de la concordance entre les différents Ac spécifiques de la MC, notamment, celles publiées par :

- Frulio et al, qui avaient sélectionnés 730 patients repartis selon l'âge en 2 groupes : Groupe A (6mois-4ans) et le groupe B (moins de 2ans). L'évaluation de la concordance globale entre la recherche des IgA et IgG anti-DGP et celle des IgA anti-tTG, par ELISA, avait montré une bonne concordance entre les IgA anti-tTG et les IgA anti-DGP dans le "Groupe A" et une meilleure concordance dans le "Groupe B". Quant à la concordance entre les IgA anti-tTG et les IgG anti-DGP, elle était modérée dans le "Groupe A" et élevée dans le "Groupe B"<sup>(3)</sup>.

- Dahlbom et al, avaient décrit une concordance entre les IgA/IgG anti-tTG et les IgA/IgG anti-tTG/DGP de 99% alors qu'elle était de 97% entre les IgA/IgG anti-tTG et IgA/IgG anti-DGP seules. Tandis que la concordance entre les 2 tests contenant des DGP était de 98%<sup>(4)</sup>.

#### **IV. 2- Évaluation des performances diagnostiques des tests ELISA et IFF dans la recherche des anticorps spécifiques de la Maladie Cœliaque**

Nos résultats ont montré une excellente sensibilité et spécificité du test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) détectant, à la fois, les IgA et les IgG dirigées contre le DGP et contre le néo-épitope de la tTG, contrairement au test IFF (FIDIS™ Celiac DPG) qui ne détecte que les IgA anti-tTG, anti-DGP et AGA. L'évaluation des valeurs diagnostiques a montré concernant le test :

- IFF : une sensibilité et une spécificité supérieures aux données de la littérature, notamment celles publiées par Rashtak et al, en 2008 dont la sensibilité était de 83% et la spécificité de 92,7%<sup>(2)</sup>. Cette différence pourrait s'expliquer par des différences dans les critères d'inclusion et d'exclusion des patients et le nombre de cas étudiés.

- ELISA : une sensibilité et une spécificité différentes de celles obtenues par Rashtak et al dont la sensibilité était de 83,7% et la spécificité de 91,9%. Ceci pourrait s'expliquer par la détection exclusive, par le test ELISA que nous avons utilisé, des Ac dirigés contre le néo-épitope contrairement au test ELISA utilisé par Rashtak et al<sup>(2)</sup>.

L'évaluation des valeurs diagnostiques des Ac spécifiques de la MC constituent l'objet d'intérêt de grandes équipes de recherche de par le monde, parmi lesquelles figurent :

- Sakly et al, dans une étude cas-témoins, avaient recherché les IgA et IgG anti-DGP sur 297 sujets adultes et enfants incluant des sujets sains, et avaient obtenu pour les :

- IgA anti-DGP, une sensibilité de 97% et une spécificité de 90,7% ;

- IgG anti-DGP, une sensibilité de 94,2% et une spécificité de 95,4%<sup>(5)</sup>.

- Lammi et al avaient recherché les Ac anti-DGP par IFF et avaient analysé rétrospectivement l'apparition des Ac anti-DGP avant la séroconversion des anti-tTG. Ils avaient sélectionné 92 enfants atteints de MC avec confirmation histopathologique et 82 enfants contrôles (anti-tTG négatifs) exprimant soit HLA-DQ2 soit HLA-DQ8. La recherche des IgA anti-DGP avait une sensibilité de 92,4% et une spécificité de 97,6% ; et celle des IgG anti-DGP avait une sensibilité de 97,8% et une spécificité de 97,6%<sup>(6)</sup>.

- Frulio et al : avaient comparé les performances diagnostiques des IgA et IgG anti-DGP à celles des IgA anti-tTG. La sensibilité et la spécificité des IgA anti-tTG était supérieures à celles des IgA et IgG anti-DGP. Ils avaient conclu à ce que les IgA anti-tTG pouvaient être utilisées comme test de dépistage de la MC chez les enfants de moins de 6 mois selon les critères de l'ESPGHAN 2012<sup>(3)</sup>.

-En 2016, un rapport publié par les experts de l'agence américaine "AHRQ" (Agency for Healthcare Research and Quality) en collaboration avec le centre "EPC"(Southern California Evidence-based Practice Center) avait discuté les performances diagnostiques des méthodes non-invasives utilisées en pratique médicale courante pour le diagnostic de la MC, dont la sérologie, le typage HLA et l'utilisation des vidéo-capsules en endoscopie<sup>(7)</sup>. Les tests diagnostiques utilisés seuls ou en combinaison dans différentes populations avaient été comparés aux résultats des biopsies duodénales standards de référence. La recherche a été effectuée grâce aux moteurs de recherche "PubMed®, Embase® et la Cochrane Library" de 1990 à Mars 2015. Les méta-analyses avaient démontré l'excellente performance diagnostique des tests détectant les IgA anti-tTG avec une sensibilité de 92,5% et une spécificité de 97,9% et l'excellente spécificité des tests détectant les IgA EMA avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 99%. Des résultats prometteurs avaient été rapportés concernant les tests de dosage des IgA anti-DGP avec une sensibilité de 87,8% et une spécificité de 94,1%, dans une méta-analyse publiée par Lewis et al, en 2010<sup>(8)</sup>. La combinaison de la recherche des anti-DGP à celle des anti-tTG aboutissait à une amélioration de la sensibilité mais une perte de spécificité. Globalement, nous constatons que malgré les variabilités de la sensibilité entre notre étude et les données de la littérature, l'évaluation est la même avec un test ELISA plus sensible pour le dosage des 2 Ac anti-tTG et anti-DGP seuls ou



combinés.

#### IV. 3- Étude de la corrélation entre les résultats des tests ELISA et IFF dans la recherche des anticorps spécifiques de la Maladie Coeliaque

Nous avons constaté des corrélations positives, quant au dosage des 2 Ac anti-tTG et anti-DGP dans notre population malade, de telles données sont comparables à celles publiées par Rashtak et al<sup>(2)</sup> ayant donné un coefficient de corrélation de Spearman  $\rho = 0,81$  pour les Ac anti-tTG et  $\rho = 0,71$  pour les Ac anti-DGP.

#### IV. 4- Étude des différentes combinaisons d'anticorps dans le diagnostic de la Maladie Coeliaque

La recherche combinée des Ac spécifiques de la MC en améliore nettement le diagnostic. En outre, la détection combinée des IgA et des IgG anti-DGP avait démontré de très bonnes performances diagnostiques dans les cas pédiatriques avec forte suspicion de MC<sup>(9, 10)</sup>. Ainsi, les chercheurs avaient besoin de prouver l'importance de telles combinaisons afin d'éviter aux patients la biopsie duodénale invasive, notamment :

- Dahlbom et al, qui avaient essayé de démontrer l'utilité de rechercher les IgA et les IgG anti-tTG et anti-DGP et les IgA/IgG anti-complexe "tTG-DGP" dans le diagnostic de la MC chez les enfants. Le test ELISA IgA/IgG anti-tTG avait les meilleures performances diagnostiques avec une sensibilité de 96% et une spécificité de 99,5% avec un AUC de 0,996 (IC 95% : 0,992 – 1 ;  $p < 0,0001$ )<sup>(4)</sup>. Ainsi, la détection d'un seul Ac est insuffisante dans le dépistage de la MC chez les enfants en raison des cas de déficit en IgA. L'inclusion des antigènes de DGP dans les tests combinés IgA/IgG semble diminuer les performances diagnostiques alors que la recherche des IgA/IgG anti-tTG possède un intérêt potentiel dans le diagnostic précoce de la MC chez les enfants, incluant les cas de déficit en IgA<sup>(4)</sup>.

- Selon Brusca, la combinaison des tests de recherche des "IgG anti-DGP + IgA anti-tTG" montrait une meilleure sensibilité qu'un test pris seul<sup>(11)</sup>.

- Barada et al, avaient recherché les IgA anti-tTG, IgA anti-DGP et IgA EMA chez 999 adultes présentant une symptomatologie en faveur de la MC. Ils avaient défini, concernant la combinaison IgA anti-tTG + IgA anti-DGP, une sensibilité de 72% avec une spécificité de 97%, alors que la recherche des IgA anti-tTG seules avait la même sensibilité mais une spécificité plus élevée de 98%.<sup>(12)</sup>

- Wolf et al, avaient recherché les IgA anti-tTG et les IgG anti-DGP chez 1071 enfants parmi lesquels 27 présentaient un déficit sélectif en IgA et. Ils avaient obtenu :

- IgA anti-tTG : une sensibilité de 88% avec une spécificité de 97%.

- IgA anti-tTG + IgG anti-DGP chez :

- les enfants sans déficit : une sensibilité de 89% avec une spécificité de 95%

- les enfants atteints d'un déficit en IgA : une sensibilité de 29% avec une spécificité de 100%<sup>(13)</sup>.

- Oyaert et al, avaient évalué si la combinaison des tests recherchant les "IgA anti-tTG + IgG anti-DGP" en prenant en compte les taux en Ac, améliorerait l'interprétation clinique des résultats. Ils avaient calculé les rapports de vraisemblance pour différentes combinaisons en Ac en utilisant des données obtenues à partir de 156 patients atteints de maladie coeliaque et 974 patients contrôles atteints d'autres pathologies. Tous les patients avaient fait l'objet d'une biopsie duodénale. Les rapports de vraisemblance augmentent considérablement avec la double positivité en Ac et avec l'augmentation des taux en IgA anti-tTG et IgG anti-DGP<sup>(14)</sup>. Ainsi, la combinaison des "IgA anti-tTG + IgG anti-DGP" améliore le diagnostic sérologique de la MC.

- Selon Mooney et al, la MC est sous-diagnostiquée. Plusieurs patients font une endoscopie mais sans poser le diagnostic de la MC alors qu'ils présentent des signes très évocateurs de la maladie. Ils avaient réalisé une étude prospective sur 2 groupes de patients :

- Groupe 1 : 55 Patients à haut risque de développer la MC avec des IgA EMA positifs chez lesquels ont été recherchés les Ac anti-DGP et anti-tTG ;

- Groupe 2 : 508 Patients contrôles atteints d'une autre pathologie ayant fait l'objet d'une biopsie duodénale chez lesquels les Ac anti-DGP ont été recherchés.

Selon cet algorithme décisionnel, la sensibilité pour diagnostiquer la MC atteint 98,5% et son utilisation pourrait réduire le recours à la biopsie duodénale de 35%<sup>(15)</sup>. La recherche des Ac anti-DGP (IgA et IgG), avant le recours à la biopsie duodénale, améliore le diagnostic de la MC.



## V-Conclusion

Le nouveau test ELISA dosant les IgA/IgG anti-tTG/DGP (AESKULISA® CeliCheck New Generation), exploité dans notre étude, offre la détection exclusive de l'anticorps dirigé contre un antigène spécifique de la MC qui est le néo-épitope de la tTG ce qui est à l'origine de l'augmentation de sa spécificité. La haute sensibilité de ce test est essentiellement liée à la détection des anticorps d'isotypes IgG et IgA dirigés contre le néo-épitope de la tTG et le DGP ce qui nous autorise à éviter le dosage des IgA sériques et élimine les faux négatifs due au déficit sélectif en IgA. Enfin, nos résultats nous ont permis de définir le test ELISA (AESKULISA® CeliCheck New Generation) comme excellent test de dépistage et de suivi des patients cœliaques au même titre que l'immunofluorimétrie en flux (IFF).

## Références

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP, ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54(1):136-160.
2. Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA. Comparative Usefulness of Deamidated Gliadin Antibodies in the Diagnosis of Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6(4):426-370.
3. Frulio G, Polimeno A, Palmieri D, Fumi M, Auricchio R, Piccolo E, Carandente Giarrusso P. Evaluating diagnostic accuracy of anti-tissue Transglutaminase IgA antibodies as first screening for Celiac Disease in very young children. *Clin Chim Acta* 2015;446:237-240.
4. Dahlbom I, Nyberg BI, Berntson L, Hansson T. Simultaneous detection of IgA and IgG antibodies against tissue transglutaminase: The preferred pre-biopsy test in childhood celiac disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2016;76(3):208-216.
5. Sakly W, Mankai A, Ghdes A, et al. Performance of anti-deamidated gliadin peptides antibodies in celiac disease diagnosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36(6):598-603.
6. Lammi A, Arikoski P, Simell S, Kinnunen T, Simell V, Paavanen-Huhtala S, Hinkkanen A, Veijola R, Knip M, Toppari J, Vaarala O, Simell O, Ilonen J. Antibodies to deamidated gliadin peptide in diagnosis of celiac disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60(5):626-631.
7. Maglione MA, Okunogbe A, Ewing B, Grant S, Newberry SJ, Motala A, Shanman R, Mejia N, Arifkhanova A, Shekelle P, Harmon G. Diagnosis of Celiac Disease. Comparative Effectiveness Review N°162. Effective Healthcare Program. AHRQ Publication 2016;No. 15(16)-EHC032-EF.
8. Lewis NR, Scott BB. Meta-analysis: deamidated peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31(1):73-81.
9. Olen O, Gudjo'nsdo' ttir AH, Browaldh L, Hessami M, Elvin K, Liedberg AS, Neovius M, Grahnquist L. Antibodies against deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase for diagnosis of pediatric celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:695-700.
10. Vermeersch P, Geboes K, Marie'n G, Hoffman I, Hiele M, Bossuyt X. Serological diagnosis of celiac disease: comparative analysis of different strategies. *Clin Chim Acta* 2012;413:1761-1767.
11. Brusca I. Overview of biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. *Adv Clin Chem* 2015;68:1-55.
12. Barada K, Habib RH, Malli A, et al. Prediction of celiac disease at endoscopy. *Endoscopy* 2014;46(2):110-119.
13. Wolf J, Hasenclever D, Petroff D, et al. Antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-controlled, international, multicentre study of 376 children with coeliac disease and 695 controls. *PLoS One* 2014;9(5):e97853.
14. Oyaert M, Vermeersch P, De Hertogh G, Hiele M, Vandeputte N, Hoffman I, Bossuyt X. Combining antibody tests and taking into account antibody levels improves serologic diagnosis of celiac disease. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(10):1537-1546.
15. Mooney PD, Wong SH, Johnston AJ, Kurien M, Avgerinos A, Sanders DS. Increased Detection of Celiac Disease With Measurement of Deamidated Gliadin Peptide Antibody Before Endoscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13(7):1278-1284.e1.