

### 3. Dosages thyroïdiens pour le Clinicien et le Biologiste

#### 3. A. Méthodes de dosage de la thyroxine totale (T4T) et de la triiodothyronine totale (T3T)

La T4 est l'hormone principale sécrétée par la thyroïde. La totalité de la T4 circulante provient de la sécrétion thyroïdienne, alors que seulement près de 20 % de la T3 circulante est d'origine thyroïdienne. L'essentiel de la T3 dans le sang est produit par des enzymes dans des tissus non-thyroïdiens par 5' monodésiodation de la T4 (121). En fait, la fonction de la T4 apparaît comme celle d'une pro-hormone de la T3, biologiquement plus active. La majeure partie de la T4 circulante (~ 99,98 %) est liée à des protéines de transport plasmatiques spécifiques: la thyroxin binding globulin (TBG) (60-75 %), TTR/TBPA (pré-albumine/transthyrétine) (15-30 %) et l'albumine (~ 10 %) (12,16). Approximativement 99,7 % de la T3 circulante sont liés à des protéines de transport plasmatiques, et plus spécifiquement à la TBG. L'affinité de celle-ci pour la T3 ne correspond qu'à 10 % de celle pour la T4 (12). Les hormones thyroïdiennes liées aux protéines ne pénètrent pas dans les cellules et sont ainsi considérées comme biologiquement inertes. Elles fonctionnent comme réservoirs d'hormones thyroïdiennes circulantes alors que les hormones libres présentes à faible concentration entrent facilement dans les cellules par des mécanismes spécifiques de transport membranaire pour exercer leurs effets biologiques. Dans l'hypophyse, le mécanisme de rétrocontrôle négatif des hormones thyroïdiennes exercé sur la sécrétion de la TSH est principalement médié par la T3 qui est produite *in situ* par la T4 libre entrant dans les cellules thyroïdiennes.

Techniquement, il a été plus facile de développer des méthodes de dosage des concentrations d'hormones thyroïdiennes totales (libres + liées aux protéines), que des tests qui évaluent les concentrations des fractions d'hormones libres. En effet, les concentrations totales d'hormones (T4T et T3T) sont mesurées aux niveaux « nanomolaires » alors que les concentrations d'hormones libres (T4 libre et T3 libre) le sont dans les plages « picomolaires ». Pour être valables, elles doivent être libres d'interférences dues à la concentration d'hormone totale beaucoup plus élevée.

#### 1. Les méthodes de dosage des hormones thyroïdiennes totales

Au cours des quarante dernières années, les méthodes de dosage de T4 et T3 totales (T4T et T3T) sériques ont évolué grâce à une variété d'apports technologiques. Le test PBI des années 50 qui estimait la concentration de T4T à partir de « l'iodure lié aux protéines » a été remplacé dans les années 60 par des méthodes de compétition utilisant les protéines de liaison. Ultérieurement, dans les années 70, suivirent les méthodes de dosage radio-immunologiques (RIA). Actuellement, les concentrations sériques de T4T et de T3T sont dosées par des méthodes immunologiques compétitives qui sont désormais surtout, non-isotopiques. Elles utilisent des enzymes, la fluorescence ou des molécules chimiluminescentes comme signaux (135). Les dosages d'hormones totales nécessitent la présence d'un inhibiteur (agent déplaçant ou bloquant) tel que l'acide 8-anilino-1-naphtalène-sulfonique (ANS), ou le salicylate pour libérer les hormones des protéines porteuses (136). L'inhibition de la liaison par ces agents ainsi que la dilution importante des échantillons dans les tests modernes, facilitent la liaison des hormones aux anticorps. La concentration de T3T, dix fois moindre que celle de la T4T dans le sang, présente un défi technique de sensibilité et de précision et

cela malgré l'emploi d'un volume d'échantillon plus conséquent (137). Bien qu'un dosage fiable de la T3T dans les valeurs élevées soit capital pour diagnostiquer l'hyperthyroïdie, un dosage fiable dans les plages normales est aussi important pour ajuster les dosages d'antithyroïdiens ainsi que pour détecter une hyperthyroïdie chez des patients hospitalisés, chez lesquels une valeur de T3 paradoxalement normale peut indiquer une hyperthyroïdie.

Malgré la disponibilité de préparations hautement purifiées de L-thyroxine et de L-triiodothyronine cristallisées (ex : United States, Pharmacopoeia (16201 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852) aucune méthode de référence pour la T4T ou la T3T n'a encore été établie (138,139). La nature hygroscopique des préparations cristallisées peut influencer sur l'exactitude de la pesée gravimétrique (140).

En deuxième lieu, les diluants employés pour reconstituer les préparations de L-T4 et L-T3 servant de calibrateurs sont soit des matrices de protéines modifiées, soit des préparations de sérums humains dépourvus d'hormones par divers moyens. Dans l'un ou l'autre cas, la composition de la matrice protéique du calibrateur n'est pas identique à celle du sérum du patient. Cela peut provoquer une libération par l'inhibiteur de la liaison aux protéines (ex : ANS) de quantités différentes d'hormones à partir de la matrice des protéines du calibrateur et de la TBG dans les échantillons. Cela peut avoir un impact sur l'exactitude diagnostique des dosages quand la liaison aux protéines porteuses est anormale, tel que dans les maladies non thyroïdiennes (NTI).

**Recommandation 9. Pour les fabricants développant des méthodes de dosage de la T4 totale et de la T3 totale**

*Les divergences de méthode devraient être réduites par :*

- Le développement de préparations de référence pour L-T4 et L-T3 et l'établissement de méthodes internationales de référence.
- S'assurer que les instruments ne sont pas sensibles aux différences entre le sérum humain et la matrice du calibrateur.
- S'assurer que pendant le processus du dosage, la quantité d'hormones thyroïdiennes libérées par les protéines liantes sériques est la même que celle libérée en présence du diluant du calibrateur.

**2. L'exactitude diagnostique des dosages d'hormones totales**

L'exactitude diagnostique des dosages d'hormones thyroïdiennes totales équivaldrait à celle des hormones libres si tous les patients avaient des niveaux de protéines liantes identiques (TBG, TTR/TBPA et albumine) avec des affinités similaires pour les hormones thyroïdiennes. Malencontreusement des concentrations sériques anormales de T4T et de T3T sont plus fréquemment la conséquence d'anomalies des protéines porteuses que de véritables dysfonctionnements thyroïdiens. Des anomalies de la TBG sérique, à la suite d'une grossesse ou d'une thérapie oestrogénique, ainsi que des anomalies génétiques des protéines porteuses, sont fréquemment rencontrées en pratique clinique (141). Des concentrations anormales de

TBG et/ou d'affinité pour les hormones thyroïdiennes peuvent altérer le rapport entre les dosages d'hormones libres et totales (142). En outre, le sérum de certains patients contient d'autres protéines de liaison anormales telles que des auto-anticorps anti-hormones thyroïdiennes. Ils rendent les dosages d'hormones totales non fiables pour le diagnostic (143-145). Ces anomalies des protéines de liaison compromettent l'utilisation des dosages de T4T ou de T3T isolément pour l'appréciation de l'état fonctionnel thyroïdien. Les dosages sériques de T4T et de T3T font plutôt partie de tests à deux volets incluant également une évaluation de l'état des protéines liantes. Celle-ci est réalisée, soit directement par dosage immunologique de la TBG, soit par un test « d'adsorption » [3.B2(b)]. Spécifiquement, le rapport mathématique entre la concentration d'hormones totales et le résultat du test « d'adsorption » est employé comme « index » d'hormones libres (146). Des indices d'hormones libres (IT4L et IT3L) ont été employés comme estimation de dosages d'hormones libres depuis trois décennies. Ils sont rapidement remplacés par un test immunologique, unique, d'estimation d'hormones libres [3.B3].

### 3. Intervalles de référence normaux pour les T4T et T3T sériques

Les valeurs sériques de T4T présentent une certaine variabilité selon les méthodes. La référence typique est approximativement de 58 à 160 nmol/L (4,5-12,6 µg/dL). De la même manière, les valeurs sériques de T3T sont dépendantes de la méthode employée, avec des plages de référence approchant 1,2 à 2,7 nmol/L (80 - 180 ng/dL). Les dosages d'hormones totales (T4T et T3T) devraient rester facilement disponibles pour évaluer des dosages discordants d'hormones libres.

#### **Recommandation 10. Dosage sérique de la T4 Totale et de la T3 totale**

*Des concentrations sériques anormales de T4T et de T3T sont plus souvent dues à des anomalies des protéines de liaison et non à des dysfonctionnements thyroïdiens.*

- L'utilisation de tests d'estimation de la T4L est préférable aux dosages de la T4T quand la concentration de TBG est anormale. Cependant, le dosage de la T4L peut être sans valeur diagnostique quand l'affinité de la TBG est modifiée ou des protéines liant la T4, anormales, sont présentes.
- Les dosages de T4T et de T3T doivent rester disponibles afin de conserver la possibilité d'évaluer les causes de discordances des dosages de T4L et de T3L

### 3. B. Dosages de la thyroxine libre et de la triiodothyronine libre

La T4 circulante est plus fortement liée aux protéines de transport sériques que ne l'est la T3. Par conséquent, la fraction de T4 libre (T4L) est très inférieure à celle de la T3 libre (respectivement, 0,02% et 0,2%, pour T4L et T3L). Malheureusement, les techniques physiques seules capables de séparer avec précision les hormones libres de la fraction prédominante liée aux protéines, sont techniquement exigeantes, difficiles à utiliser et relativement chères pour un usage de routine en biologie clinique. Ces méthodes (c.-à-d. dialyse à l'équilibre, ultrafiltration et filtration sur gel) sont en principe uniquement disponibles dans des laboratoires de référence.

La biologie clinique de routine utilise une variété de dosages des hormones libres. Ils estiment la concentration des hormones libres en présence des hormones liées aux protéines. Ces estimations des hormones libres emploient, soit, une stratégie à deux tests pour calculer un " index " d'hormone libre [3.B2] ou une variété d'approche de dosages du ligand (14,145,147). En réalité, malgré les affirmations des fabricants, la plupart, sinon tous les dosages de la T4L et de la T3L sont, dans une plus ou moins grande mesure, dépendants des protéines porteuses (148,149). Cette dépendance de la liaison aux protéines a un impact négatif sur l'exactitude diagnostique des méthodes de dosage des hormones libres. Elles sont, en effet, sujettes à une variété d'interférences qui peuvent conduire à des erreurs d'interprétation ou à des conclusions fausses (Tableau 1). De telles interférences incluent la sensibilité à des anomalies des protéines, aux effets *in vivo* ou *in vitro* de divers médicaments [3.B3(c)vi], à un niveau élevé d'acides gras libres et à des inhibiteurs endogènes ou exogènes de la liaison des hormones aux protéines, présents dans certaines conditions.

#### 1. Nomenclature des méthodes d'évaluation de T4 Libre (T4L) et de T3 Libre (T3L)

Une confusion considérable existe dans la nomenclature des dosages d'hormones thyroïdiennes libres. La controverse persiste quant à la validité technique des dosages eux-mêmes et de leur utilité clinique dans des conditions associées à des anomalies des protéines de liaison (145,147,148,150,151). Le dosage d'hormones libres en biologie clinique est réalisé en utilisant, soit le calcul d'index qui exige deux tests séparés, soit le dosage en une étape du ligand, soit encore en faisant appel à des méthodes par séparation physique qui isolent les hormones libres de celles liées aux protéines avant le dosage direct d'hormone dans la fraction libre. Les dosages sont étalonnés, soit, à partir de solutions qui contiennent des concentrations d'hormones établies par gravimétrie, soit, ils utilisent un calibrateur avec des valeurs assignées par une méthode de séparation physique (c.-à-d. dialyse à l'équilibre et/ou ultrafiltration). Les méthodes par séparation physique sont uniquement manuelles, techniquement exigeantes et trop onéreuses pour un usage clinique courant. L'évaluation des index d'hormones libres et les dosages directs de celles-ci sont les plus communément utilisés en biologie clinique, où ils sont généralement exécutés par des techniques automatisées d'immuno-analyse (17).

### **Recommandation 11. Nomenclature des dosages des hormones libres**

- Les méthodes de dosage des hormones libres utilisées le plus souvent en biologie clinique (index et dosages directs) ne pratiquent pas la séparation physique entre hormones “ liées ” et “ libres ” et ne dosent pas directement les concentrations d’hormones libres ! Ces tests sont typiquement et dans une plus ou moins grande mesure, dépendants des protéines de liaison et devraient être appelés de manière plus appropriée « **tests d’estimation de la concentration des hormones libres** », en abrégé ET4L et ET3L.
- En général, des tests d’estimation des hormones libres surestiment le niveau de T4 libre en présence de concentrations de protéines élevées et sous-estiment la T4 libre en cas de concentrations faibles de protéines.

Malheureusement, une pléthore de termes, prêtant à confusion, a été utilisée pour différencier les méthodes de dosage des hormones libres. La littérature est pleine d’incohérence dans la nomenclature de ces tests. Actuellement, il n’y a aucune distinction méthodologique claire entre des termes tels que “ T7 ”, “ proportion effective de thyroxine ”, “ une étape ”, “ analogue ”, “ deux étapes ”, “ titration de sites libres ”, “ séquentiel ”, “ extraction immunologique ” ou “ séquestration immunologique ”, “ dosage du ligand ” parce que les fabricants ont modifié les techniques originelles ou les ont adaptées pour l’automatisation (147). A la suite du lancement des premiers dosages “ analogues ” en une étape dans les années 70, le terme “ analogue ” a provoqué une confusion (147). Cette première génération de dosages d’hormones à l’aide d’“ analogues ” s’est avérée extrêmement dépendante des protéines de liaison. Elle a été remplacée depuis par une nouvelle génération de dosages par anticorps “ analogues ” marqués qui sont plus résistants à la présence de protéines de liaison anormales (147,152). Malheureusement, les fabricants divulguent rarement tous les composants du test ou le nombre d’étapes impliquées dans une procédure de telle façon qu’il n’est pas possible d’utiliser la nomenclature de la méthode (deux étapes, analogue, etc...) pour en déterminer l’exactitude diagnostique chez des patients présentant des protéines de liaison anormales (152).

### **2. Méthodes par calcul de l’index d’hormone libre : IT4L et IT3L**

Les méthodes d’index sont des estimations des hormones libres qui exigent deux dosages séparés (146) : un dosage des hormones totales (T4T ou T3T) et une évaluation de la concentration des protéines de liaison des hormones thyroïdiennes utilisant un test immunologique pour la TBG, ou un test “ d’adsorption ” de la T4 ou de la T3 appelé rapport de liaison des hormones thyroïdiennes (THBR pour thyroid hormone binding ratio). Les index peuvent également être calculés à partir d’un dosage de T4T associé à une évaluation de la fraction de T4 libre déterminée par dialyse avec la <sup>125</sup>I<sup>T</sup>4. Dans ce cas, la qualité et la pureté du traceur employé ont un impact critique sur l’exactitude de l’index (149,153,154).

**(a) Index qui utilisent le dosage de la TBG.** Le calcul d’un IT4L qui utilise exclusivement la TBG améliore l’exactitude diagnostique par rapport à la T4T lorsque les anomalies résultent

d'une concentration anormale de TBG. L'approche par l'index T4T/TBG n'est pas complètement dépendante de la TBG, elle ne corrige pas la présence de protéines liantes anormales différentes de la TBG ni la présence de molécules de TBG qui ont des affinités anormales (141,155-158). Donc, en dépit des avantages théoriques à utiliser un dosage de TBG direct, les index T4T/TBG sont rarement utilisés parce que la capacité de fixation de la TBG peut être altérée indépendamment de changements dans la concentration de la TBG, surtout chez des patients avec une affection non thyroïdienne (NTI pour nonthyroidal illness (99)). De plus, la liaison par la TBG reflète 60–75 % de la capacité liante totale du sérum, donc compter sur la seule TBG exclut la liaison d'hormones à la transthyréline et à l'albumine.

**(b) Index qui utilisent un ratio de liaison des hormones thyroïdiennes (THBR) ou test de capture (ou de transfert).** Les tests “ d'adsorption ” ont été utilisés pour estimer la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines depuis les années 50. Deux types différents de “ tests d'adsorption ” ont été utilisés. Les tests “ classiques ” d'adsorption ajoutent une trace de T3 ou de T4 radio-marquée à l'échantillon et permettent à l'hormone marquée de se répartir entre les protéines de liaison de la thyroxine exactement de la même manière que les hormones endogènes (146,154). Comme seulement une trace de T3 ou de T4 marquée est utilisée, l'équilibre initial est à peine modifié. La distribution du traceur dépend de la saturation des protéines liantes. L'addition d'un liant secondaire ou adsorbant (résine d'échangeuse d'anions, talc, éponge de polyuréthane, charbon de bois, ou des billes enrobées, etc.) conduit à une redistribution du traceur de T3 ou de T4 dans un nouvel équilibre qui inclut alors le liant. La quantité de traceur séquestrée par l'adsorbant dépend de la saturation des protéines liantes : elle est proportionnelle au degré de saturation des protéines liantes. La fixation du traceur par l'adsorbant mime un dosage indirect de TBG. Pour une concentration de TBG basse, les sites de liaison de la TBG sont fortement saturés en T4 de telle sorte qu'une plus petite quantité de T3 traceur se liera à la TBG et davantage capté par l'adsorbant. Inversement, quand la concentration de TBG est élevée, sa saturation de T4 est faible. Plus de traceurs occupent alors des sites inoccupés de la TBG, et moins se fixent à l'adsorbant. Malheureusement le rapport entre THBR et la concentration de TBG est non linéaire, de sorte que les dosages par index ne corrigent habituellement pas les anomalies de la T4T qui résultent de concentrations de TBG nettement anormales (158).

Il a été recommandé d'utiliser un échantillon de sérum normal comme standard pour normaliser la réponse des dosages et permettre de rendre le résultat sous forme d'un ratio par rapport à la normale c.-à-d. un “ ratio de liaison d'hormones thyroïdiennes (THBR) ” (154). Les épreuves d'adsorption “ classiques ” ont utilisé la T3 comme traceur parce que l'affinité de liaison T3-TBG inférieure à celle T4-TBG résulte en une adsorption isotopique supérieure par l'adsorbant et donc un temps de mesure plus court. Cependant, comme la validité de l'utilisation d'une épreuve d'adsorption de T3 pour corriger une valeur de T4T est contestable, quelques épreuves non isotopiques actuelles utilisent “ l'adsorption de T4 ”. Beaucoup de fabricants utilisent encore l'approche “ classique ” pour produire des épreuves d'adsorption de T3 dans lesquelles le pourcentage d'adsorption moyen normal peut varier de 25 à 40 % (mesure de la fraction liée/mesure totale). Traditionnellement, l'index de thyroxine libre, quelquefois appelé “ T7 ” est dérivé du produit d'un test d'adsorption de T3 et d'un dosage de T4T. Il est souvent exprimé en % d'adsorption (mesure de la fraction liée à l'adsorbant divisée par la mesure totale).

### **Recommandation 12. Ratio de liaison des hormones thyroïdiennes (THBR) ou test d'adsorption**

- Les tests d'adsorption devraient être appelés épreuves de “ ratio de liaison des hormones thyroïdiennes ”, abrégé : THBR et inclure l'indication de l'hormone utilisée, c.-à-d. THBR (T4) ou THBR (T3).
- Un signal de T4 est préféré à celui de la T3 pour les dosages de THBR, reflétant mieux les anomalies des protéines de liaison de la T4.
- Les valeurs de THBR devraient être rapportées comme un ratio par rapport à un sérum normal, ce dernier ayant une valeur assignée de 1,00.
- Les calculs de THBR devraient être basés sur la proportion du nombre de coups de l'adsorbant et ceux du total moins ceux de l'adsorbant, plutôt que sur la proportion des coups fixés à l'adsorbant et ceux du total.
- Le résultat THBR devrait être rapporté en plus de la valeur de l'index des hormones totales et des hormones libres.
- Les tests THBR ne devraient pas être utilisés comme une mesure indépendante de l'état thyroïdien, mais devraient être interprétés en association avec un dosage de T4T et/ou de T3T et utilisés pour calculer une estimation des hormones libres (index de T4L ou de T3L).

Les tests “ classiques ” d'adsorption de T3 ou THBR sont typiquement influencés par la concentration de T4 endogène de l'échantillon. Cette limitation peut être contournée par l'utilisation d'une très grande quantité de traceur T4 non isotopique avec une affinité pour les protéines liantes comparable à celle de la T4. Les tests THBR actuels produisent habituellement des valeurs de T4L et de T3L normales lorsque les anomalies de la TBG sont faibles (ex : pendant la grossesse). Cependant, quelques-uns de ces tests peuvent produire des valeurs d'index erronément anormales quand les patients présentent d'importantes anomalies des protéines liantes (élévation ou diminution congénitale de la TBG, hyperthyroïxémie dysalbuminémique familiale (FDH), auto-anticorps anti-hormones thyroïdiennes et NTI) et en présence de certains médicaments qui influencent la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines [3.B3(c)vi].

**(c) Index qui utilisent une détermination de la fraction des hormones libres.** Les premiers dosages des hormones libres développés dans les années 60 étaient des index, calculés à partir du produit de la fraction de l'hormone libre d'un dialysat et du dosage de la T4T (fait par PBI puis par RIA) (159,160). L'approche par index de la fraction libre a ensuite été étendue à la mesure du taux de transfert d'hormones marquées à travers une membrane séparant deux chambres contenant le même échantillon non dilué. Les index d'hormones libres calculés avec les fractions libres isotopiques ne sont pas complètement indépendants des

concentrations de TBG et en outre sont influencés par la pureté radio-chimique du traceur, la matrice du tampon et le facteur de dilution employé (161,162).

### 3. Dosages du ligand pour l'estimation de la T4 libre et la T3 libre

Ces méthodes emploient, soit une approche en deux étapes, soit en une seule. Les tests en deux étapes utilisent une séparation physique des hormones libres et liées avant le dosage des hormones libres par un dosage immunologique sensible. Alternativement, un anticorps est utilisé pour une extraction immunologique d'une partie du ligand présent dans l'échantillon avant quantification. Par contraste, les dosages du ligand en une étape visent à quantifier les hormones libres en présence des protéines de liaison. Les méthodes en deux étapes sont moins enclines aux artéfacts non spécifiques. Les méthodes à une étape peuvent être faussées quand l'échantillon et les étalons ont une affinité différente pour le traceur du test (60,145,150).

**(a) Dosage du ligand faisant appel à une séparation physique.** Les dosages de T4 libre qui isolent les hormones libres de celles liées avant un dosage immunologique sensible sont standardisés par l'utilisation de solutions de T4 préparées par gravimétrie. La séparation physique des hormones libres de celles liées est accomplie, soit avec une membrane semi-perméable qui utilise une chambre de dialyse selon une technique d'ultrafiltration, soit avec une colonne de résine d'adsorption Sephadex LH-20 (161-165).

Une méthode extrêmement sensible de dosage de T4 par RIA est nécessaire pour mesurer les concentrations picomolaires de T4 libre dans les dialysats ou la fraction libre isolée, en comparaison avec les concentrations nanomolaires de T4 totale. Bien qu'il n'y ait pas de méthodes de référence officiellement reconnues (" gold standard ") pour le dosage des hormones libres, il est généralement considéré que les méthodes qui emploient la séparation physique sont les moins influencées par les protéines liantes, et fourniraient des valeurs d'hormones libres qui reflètent le mieux le niveau des hormones libres circulantes (94,166). Cependant, les méthodes par dialyse qui emploient une étape de dilution peuvent sous-estimer la T4 libre quand les inhibiteurs de la liaison sont présents dans l'échantillon. L'adsorption de T4 à la membrane peut également poser problème (94,166). Par contraste, de telles méthodes peuvent surestimer la T4 libre sérique de malades traités à l'héparine par suite de génération *in vitro* d'acides gras libres [3.B3(c)vii] (84,97,98, 100,101,167-170). Cet effet *in vitro* de l'héparine est la cause primaire de valeurs de T4 libre faussement élevées chez les malades atteints d'une NTI (101). Les méthodes par séparation physique sont fastidieuses et trop coûteuses pour un dosage de routine en biologie clinique. Elles sont habituellement uniquement pratiquées dans les laboratoires de référence. Les méthodes de dosage de T3 libre qui emploient la séparation physique ne sont disponibles que dans quelques laboratoires de recherche spécialisés (102).

**(b) Dosage du ligand sans séparation physique.** La plupart des méthodes de dosage immunologique des hormones libres utilisées actuellement emploient un anticorps spécifique à haute affinité pour séquestrer une petite quantité de l'hormone totale de l'échantillon. Les sites de liaison inoccupés de l'anticorps sont habituellement inversement proportionnels à la concentration de l'hormone libre, et peuvent être quantifiés en utilisant l'hormone marquée par radioactivité, fluorescence ou chimiluminescence. Le signal produit est converti en une concentration d'hormones libres utilisant des calibrateurs basés sur des valeurs d'hormones libres définies par une méthode employant la séparation physique. La proportion effective d'hormones thyroïdiennes totales séquestrées varie avec le concept de la méthode, mais dépasse largement la concentration d'hormones libres réelle ; elle devrait être < 1-2 % pour

minimiser la perturbation de l'équilibre libres/liées. La séquestration active d'hormones par l'anticorps anti-hormone thyroïdienne dans le test produit une libération continue d'hormones des protéines liantes et ainsi la perturbation de l'équilibre hormones liées/libres. Les clés de validité de ces méthodes sont doubles. En premier lieu, il est nécessaire d'utiliser des conditions qui maintiennent l'équilibre entre les hormones libres et celles liées aux protéines, et de minimiser les effets de dilution qui affaiblissent l'influence de tout inhibiteur endogène présent dans l'échantillon. Deuxièmement, il est important d'utiliser des calibrateurs sériques qui contiennent des concentrations d'hormones libres connues et qui se comportent pendant le dosage d'une manière identique aux échantillons des patients. Trois approches générales ont été utilisées pour développer des dosages immunologiques de T4 libre et T3 libre de ce type : (i) deux étapes avec hormone marquée; (ii) une étape avec analogue marqué; et (iii) anticorps marqués.

### **Recommandation 13. Pour fabricants développant des dosages des hormones libres**

- Les méthodes qui ne séparent pas physiquement les hormones libres de celles liées ne devraient pas extraire plus de 1-2% de l'hormone totale liée aux protéines, afin que l'équilibre thermodynamique soit maintenu dans la mesure du possible. Minimiser les effets de la dilution qui affaiblissent l'influence de tout inhibiteur endogène présent dans l'échantillon.
- Utiliser des calibrateurs sériques contenant des concentrations d'hormones libres connues qui se comportent dans le test d'une façon identique aux échantillons des patients.
- Exécuter la procédure du dosage à 37°C.

#### (i) Méthodes à deux étapes, hormones marquées /rétro-titrage.

Les méthodes à deux étapes ont été d'abord développées pour la recherche vers la fin des années 70 et ont été adaptées par la suite pour produire des méthodes commerciales pour la T4 libre et la T3 libre. Dans une première étape d'incubation, ces méthodes ont utilisé un anticorps anti-hormone avec une affinité élevée ( $> 10^{11}$  mol/L) lié à un support solide (tube, particules ou Sephadex ultrafin) pour séquestrer une petite proportion d'hormone totale d'un échantillon de sérum dilué. Après une courte période d'incubation, les éléments non liés sont éliminés avant la deuxième étape dans laquelle une quantité suffisante d'hormone marquée est ajoutée pour se lier aux sites inoccupés de l'anticorps. Après lavage, la quantité d'hormone marquée liée à l'anticorps fixé à la phase solide est quantifiée grâce à des standards gravimétriques ou de calibrateurs qui ont des valeurs d'hormones libres définies par une méthode de référence. Les méthodes en une étape, faisant appel à des analogues d'hormones marqués ont été introduites vers la fin des années 70. Ces nouvelles méthodes étaient moins exigeantes en main-d'œuvre que les techniques en deux étapes. En conséquence, les méthodes en deux étapes ont perdu en popularité en dépit d'études comparatives montrant qu'elles sont moins affectées par la concentration d'albumine et les anomalies des protéines liantes qui ont un impact négatif sur l'exactitude diagnostique des épreuves par analogues en une étape (147,171-173).

(ii) Méthodes par analogues marqués d'hormones en une étape

La validité physico-chimique des méthodes en une étape par analogues marqués d'hormones était dépendante du développement d'un analogue possédant une structure moléculaire totalement non réactive avec les protéines sériques, mais pouvant se lier aux sites inoccupés de l'anticorps anti-hormone. Quand ces conditions sont remplies, l'analogue, qui est chimiquement associé à un signal tel qu'un isotope ou une enzyme, peut entrer en compétition avec les hormones libres pour un nombre limité de sites de liaison de l'anticorps dans un format classique de dosage immunologique par compétition. Bien que conceptuellement attirante, cette approche est techniquement difficile à réaliser dans la pratique, en dépit d'affirmation de succès initiaux. Les méthodes par analogues ont été principalement mises au point pour des valeurs normales de T4libre en présence de TBG élevée (ex : grossesse). Cependant, il a été établi que leur exactitude diagnostique était faible en présence de concentrations anormales d'albumine, FDH, NTI, concentrations élevées d'acides gras libres ou d'auto-anticorps anti-hormones thyroïdiennes. Des efforts considérables ont été faits pendant les années 80 pour corriger ces problèmes par l'addition de produits chimiques brevetés pour bloquer la liaison des analogues à l'albumine ou en ajustant de façon empirique les valeurs du calibrateur pour corriger les biais dus aux protéines. Cependant, la plupart des méthodes avec analogues ont été abandonnées après une décennie de critiques, parce que ces problèmes n'ont pas trouvé de solution satisfaisante (147).

(iii) Méthodes par anticorps marqués

Les méthodes par anticorps marqués dosent également les hormones libres à partir de la fraction des sites des anticorps anti-hormones occupés. Cette approche compétitive utilise des immuno-absorbants spécifiques pour évaluer les sites de liaison de l'anticorps inoccupé dans le mélange réactionnel. Une approche apparentée a été l'utilisation en phase solide de complexes hormone/protéine non marqués (quelquefois évoqués sous le nom de "analogues") ne réagissant pas de manière significative avec les protéines sériques, pour quantifier les sites de liaison inoccupés de l'anticorps anti-hormone dans la phase liquide. La base physico-chimique de ces méthodes par anticorps marqués suggère qu'elles peuvent être sujettes aux mêmes erreurs que les méthodes plus anciennes d'analogues. Cependant, les différences physico-chimiques dues à la liaison d'analogues au support solide s'accompagnent de différences cinétiques qui résultent en une diminution de l'affinité des analogues pour les protéines liantes endogènes et ainsi en un dosage de l'hormone libre plus fiable. L'approche par l'anticorps marqué est actuellement l'approche préférée pour le dosage des hormones libres sur la plupart des plates-formes automatisées.

**(c) Performance des dosages de T4 libre et de T3 libre dans différentes situations cliniques .** La seule raison de choisir une méthode pour doser les hormones thyroïdiennes libres (T4L ou T3L) de préférence à un dosage des hormones thyroïdiennes totales (T4T ou T3T) est d'améliorer l'exactitude diagnostique afin de détecter une hypo- ou une hyperthyroïdie chez des malades avec des anomalies de liaison des hormones thyroïdiennes qui compromettent la valeur diagnostique du dosage des hormones totales (60). Malheureusement, l'exactitude diagnostique des méthodes disponibles pour le dosage des hormones libres ne peut pas être assurée, ni par le type de méthode (une étape, deux étapes, anticorps marqué, etc...) ni par une vérification *in vitro* de leur validité technique, tel qu'un test de dilution de l'échantillon. Le calcul des index (IT4I et IT3I) aussi bien que les méthodes de mesure du ligand sont toutes dans une certaine mesure dépendantes des protéines, et peuvent donner des valeurs non fiables quand les protéines liantes présentent des anomalies significatives (148). Les dosages des hormones libres devraient être exécutés à 37°C sachant

que les dosages exécutés à température ambiante augmentent faussement les valeurs des échantillons quand ils ont une concentration de TBG très basse (174,175).

#### **Recommandation 14. Utilité clinique du dosage de la T3 Libre sérique**

*Le dosage de la T3 sérique a peu de spécificité ou de sensibilité pour diagnostiquer l'hypothyroïdie, car la conversion de la T4 en T3 maintient des concentrations de T3 normales jusqu'à ce que l'hypothyroïdie devienne sévère. Les malades avec une NTI ou une privation calorique ont typiquement des valeurs de T3T et de T3libre basses. Le dosage de la T3 sérique, interprété avec celui de la T4libre, est utile pour diagnostiquer des présentations complexes ou inhabituelles d'hyperthyroïdie et certaines conditions rares :*

- Une T3 sérique élevée est souvent un signe précurseur de rechute de l'hyperthyroïdie de Basedow.
- Le rapport T3T/T4T peut être utilisé pour distinguer les hyperthyroïdies liées à la maladie de Basedow et celles d'origine différente.
- Spécifiquement, un rapport de T3T/T4T ( $> 20 \text{ ng}/\mu\text{g}$  ou  $> 0,024 \text{ mol/L}$ ) élevé suggère une stimulation thyroïdienne comme dans la maladie de Basedow.
- Le dosage de la T3 sérique peut être utilisé pour surveiller la réponse aiguë à un traitement de la thyrotoxicose de Basedow.
- Une T3 sérique élevée ou paradoxalement normale peut indiquer une hyperthyroïdie chez un patient atteint d'une NTI avec une TSH indétectable ( $< 0,01 \text{ mUI/L}$ ).
- Une T3 sérique élevée ou paradoxalement normale peut être l'indice d'une hyperthyroïdie induite par l'amiodarone.
- Chez les malades porteurs d'un goitre vivant en régions de carence en iode, il est indiqué de doser la T3L en plus de la TSH pour détecter une thyrotoxicose à la T3 causée par une autonomie focale ou multifocale.
- Une T3 sérique élevée est fréquemment observée en présence d'un goitre congénital, du fait d'un défaut d'organification de l'iode (anomalie de la TPO) ou d'une anomalie de la synthèse de la thyroglobuline.
- Une T3 sérique élevée précède généralement une thyrotoxicose induite par l'iodure chez les malades atteints d'un goitre multi-nodulaire ancien.
- Une T3 sérique élevée est souvent constatée lors de la sécrétion excessive de TSH par une tumeur de l'hypophyse.

- Une T3 sérique augmentée est souvent constatée dans les syndromes de résistance aux hormones thyroïdiennes qui habituellement se présentent sans signes d'hyperthyroïdie clinique.
- Le dosage de la T3 sérique est utile pour s'assurer de la compliance à un traitement freinateur par la T3 avant une scintigraphie à l'Iode 131 pour cancer thyroïdien différencié.
- Le dosage de la T3 sérique est utile pour distinguer une hyperthyroïdie (sub-clinique) légère (TSH basse/T4L normale) d'un état de thyrotoxicose à T3, quelquefois provoquée par des aliments diététiques contenant de la T3.
- Le dosage de la T3 sérique est utile pour détecter une carence en iode (caractérisée par T4 basse/T3 élevée).
- Le dosage de la T3 sérique peut être utile dans la surveillance d'un traitement par antithyroïdiens de synthèse pour corriger un excès persistant de T3, en dépit de valeurs de T4 sériques normales ou basses.
- Le dosage de la T3 sérique peut être utilisé pour détecter une rechute précoce de thyrotoxicose après arrêt d'un traitement par anti-thyroïdiens.
- Le dosage de la T3 sérique peut être utilisé pour établir l'ampleur de l'excès de T3 lors d'une thérapie suppressive par la T4 ou après un surdosage intentionnel de T4.

La fréquence d'anomalies des protéines de liaison à la base de discordances entre concentrations des hormones thyroïdiennes totales et libres a conduit à développer des tests visant à doser les hormones libres. Malheureusement, aucun test de T4L n'est, à l'heure actuelle, exact dans toutes les conditions cliniques. Quand la concentration de TBG est anormale, la plupart des méthodes T4L donnent des résultats qui sont d'un point de vue diagnostique plus utiles que le dosage de la T4T. Cependant, les artéfacts pré-analytiques ou analytiques dans les dosages surviennent dans beaucoup de situations associées avec des anomalies des protéines liantes: lorsque la liaison du traceur à l'albumine est anormale ; en présence de médicaments qui déplacent la T4 de la TBG ; pendant des phases critiques des NTI ; et pendant la grossesse (Tableau 1). La fréquence d'artéfacts dans les tests de T4L suggère que la TSH ou le rapport TSH/T4L est un paramètre thyroïdien plus fiable qu'une évaluation de T4L seule.

En cas de suspicion d'un résultat inapproprié de T4L, la T4L devrait être vérifiée par une méthode différente (habituellement dans un laboratoire différent). En outre, ou alternativement, la relation T4L et T4T peut être vérifiée pour déceler une éventuelle discordance car une interférence n'affecte que rarement les deux dosages au même degré et dans la même sens.

(i) Grossesse

L'augmentation de la TBG sérique et les concentrations basses de l'albumine pendant la grossesse, provoquent des variations de dosage de T4L largement dépendantes de la méthode employée [2.A3] (47,59). Les méthodes dépendantes de l'albumine peuvent produire des valeurs de T4L basses chez jusqu'à 50 pour cent des patients et être inadéquates pour évaluer l'état thyroïdien pendant la grossesse à cause du biais négatif dû à la diminution progressive de la concentration de l'albumine sérique au troisième trimestre (59). Inversement, les méthodes telles que la dialyse au moyen d'un radio-isotope ont tendance à montrer un biais positif probablement lié aux impuretés du traceur (60). L'usage de plages de référence spécifiques à la méthode et la définition de valeurs en fonction des trimestres peuvent améliorer l'exactitude diagnostique du dosage des hormones libres pendant la grossesse. Cependant, peu, sinon aucun fabricant n'a développé de tels renseignements.

**Recommandation 15. Effets d'anomalies des protéines porteuses des hormones thyroïdiennes dans les dosages de T4L**

*Les anomalies des protéines porteuses provoquent des artefacts pré-analytiques ou analytiques dans les dosages de T4L. La fonction thyroïdienne devrait être évaluée à partir du rapport TSH/T4T quand:*

- La liaison du traceur du test à l'albumine est anormale (ex : FDH).
- Le malade prend des médicaments qui déplacent la T4 de la TBG, ex : phénytoïne, carbamazépine ou furosémide .
- Le malade a une maladie non thyroïdienne critique ou sévère.

(ii) Enfants prématurés

Un taux de thyroxine bas sans élévation de la TSH est communément rencontré chez les enfants prématurés de moins de 28 semaines de gestation (39,176). Quelques évidences cliniques suggèrent qu'un traitement à la L-T4 pourrait améliorer l'évolution neurologique (176). Cependant, comme décrit ci-dessus, il est possible que les différences entre méthodes de dosage de T4L risquent de compromettre la fiabilité de la détection d'hypothyroxinémie chez le prématuré.

(iii) Anomalies génétiques des protéines porteuses

Les variations héréditaires et acquises de l'albumine et de la TBG avec une affinité pour T4 ou T3 altérée peuvent provoquer des concentrations d'hormones totales anormales chez des sujets euthyroïdiens avec des concentrations d'hormones libres normales (141). Le variant de l'albumine responsable de l'hyperthyroxinémie dysalbuminémique familiale (FDH) a une affinité supérieure marquée pour la T4 et de nombreux traceurs analogues de T4 résultant en des valeurs de T4 libre sérique faussement élevées dans ces méthodes (145,177). Dans la FDH, les valeurs de la T4T sérique et de l'IT4L sont élevées. Certains tests de T4L donnent également des valeurs supra-normales, alors que les dosages de la T3T, la T3L, la TSH et la T4L sériques, par d'autres méthodes, y compris la dialyse à l'équilibre, sont normaux (177).

L'absence de reconnaissance de la présence du variant d'albumine FDH, qui peut se rencontrer avec une prévalence jusqu'à 1 pour 1000 dans quelques populations latino-américaines, peut résulter en une interprétation erronée du test et même mener à l'ablation de la thyroïde (178).

#### (iv) Auto-anticorps

Le sérum de certains patients contient des auto-anticorps anti-hormones thyroïdiennes qui sont à l'origine d'artéfacts méthodologiques dans les dosages d'hormones totales ou libres (143,145). Les interférences dues aux anticorps dépendent du type de méthode. Le traceur T4 ou T3 lié aux anticorps endogènes est faussement classé comme lié par les méthodes par adsorption, ou libre par les méthodes à double anticorps, menant respectivement à des valeurs de T4T ou T3T sériques erronément élevées ou basses (144,145). Les traceurs analogues de T4 utilisés dans certaines méthodes de T4L peuvent se lier à ces auto-anticorps, donnant des résultats de T4L sérique faussement élevés. Des anticorps anti-phase solide interférant dans des méthodes d'hormones libres à anticorps marqués ont même été décrits (179).

#### (v) Thyrotoxicose et hypothyroïdie

Le rapport entre T4 libre et totale et T3 dans la thyrotoxicose est non linéaire. Dans les thyrotoxicoses sévères, les élévations de la T4T et de la T4L sont disproportionnées. Cette non linéarité reflète autant une baisse de la concentration de TBG qu'une saturation de la capacité de liaison de la TBG en dépit de l'augmentation de la liaison à la TTR et à l'albumine (180). De la même façon, les concentrations de T3L peuvent être sous-estimées par suite d'une capacité de liaison T4-TBG plus élevée. La situation réciproque existe dans les hypothyroïdies sévères avec une occupation réduite de toutes les protéines de liaison (180). Dans cette situation, un excès de sites de liaison inoccupés peut atténuer la réponse de la T4L au traitement. Cela suggère que chez un malade hypothyroïdien une dose initiale de charge de L-T4 est l'approche la plus rapide pour restaurer le taux de T4L à un niveau thérapeutique.

#### (vi) Médicaments qui entrent en compétition avec la liaison des hormones thyroïdiennes

Quelques agents thérapeutiques et diagnostiques tel que phénytoïne, carbamazépine ou furosémide peuvent, de manière compétitive, inhiber la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines sériques. La réduction des sites de liaison disponibles résulte en une augmentation aiguë de la T4L et dans certains cas de l'action hormonale comme mis en évidence par une réduction de la TSH (181). Les augmentations de T4L sont influencées par la dilution du sérum pratiquée dans la méthode. Elles sont également constatées dans les méthodes de dialyse (182,183). Durant l'administration chronique de ces substances compétitives la clairance d'hormones est augmentée. Cependant, le système rétablit un "équilibre normal" : le niveau de T4L se normalise aux dépens d'une concentration de T4T abaissée. A ce stade, la suppression de la médication causera une chute initiale de T4L dès lors que plus de sites sur les protéines porteuses deviennent disponibles. Il s'en suit un retour de la T4L à la normale ; l'équilibre est ré-établi par une sécrétion plus importante d'hormones par la thyroïde. La durée et l'ampleur de ces effets dépendent de la demi-vie de l'agent compétiteur.

Plusieurs médicaments et agents entrent en compétition avec la liaison de la T4 et de la T3 à la TBG. et provoquent une augmentation aiguë de disponibilité de T4L ou de T3L. Beaucoup de ces agents thérapeutiques fréquemment prescrits diffèrent dans leur affinité pour la TBG par rapport à la T4 (96,184). Le furosémide, par exemple, se lie à la TBG mais avec une affinité qui est approximativement trois fois moindre que celle de la T4 alors que l'aspirine se lie avec une affinité sept fois moindre que la T4 (170,185). *In vivo* la compétition observée

avec de tels agents est en rapport avec leur affinité pour la TBG plutôt qu'avec leurs niveaux thérapeutiques, la fraction libre ou l'affinité pour les protéines non - TBG, en particulier l'albumine (170,186).

Les dosages actuels de T4L qui emploient une dilution peuvent ne pas détecter une élévation de la T4L due à la présence d'agents compétiteurs. Par exemple, un échantillon qui contient à la fois de la T4L (fraction libre 1 pour 4000) et un inhibiteur compétitif (fraction libre 1 pour 100) soumis à une dilution séquentielle maintiendra la concentration de T4L jusqu'à une dilution de 1 pour cent, suite à la dissociation progressive de la T4 des protéines liantes. Par contraste, la concentration de la substance libre diminuera sensiblement, après une dilution de 1 pour 10. Donc, l'effet de déplacement des hormones exercé par des substances qui rivalisent pour la liaison de la T4 sera sous-estimé dans les dosages de T4L utilisant un protocole de dilution élevée de l'échantillon. L'usage de dialyse symétrique à l'équilibre et d'ultrafiltration de sérum non dilué peut minimiser cet artéfact (94,165,187,188).

#### (vii) Artéfacts induits par le traitement à l'héparine

Il est bien connu qu'en présence d'une concentration d'albumine normale, les concentrations d'acides gras libres (FFA) > 3mmol/L augmentent la T4L en déplaçant l'hormone de la TBG (84,97,98,100, 101,167-170). Le sérum de malades traités à l'héparine, y compris des préparations d'héparine de faible poids moléculaire, peut présenter des valeurs de T4L faussement élevées, suite à une activité *in vitro* de la lipase induite par l'héparine qui augmente les acides gras libres. Ce problème est observé, même avec des doses d'héparine aussi faibles que 10 unités et est amplifié par la conservation de l'échantillon. Des niveaux de triglycérides sériques augmentés, des concentrations basses d'albumine sérique ou une incubation prolongée durant le dosage à 37°C peuvent accentuer ce problème.

#### (viii) Maladie non thyroïdienne grave

Un grand nombre d'observations rassemblées depuis plus de deux décennies traitent de la spécificité de différentes méthodes de dosage de la T4L chez les malades hospitalisés avec une NTI [2.B2]. Cette littérature peut amener à une confusion, et est compliquée par l'hétérogénéité des populations de patients étudiés et la qualité des résultats qui sont méthode-dépendants. Avec le temps, les fabricants ont progressivement modifié leurs méthodes, dans une tentative d'améliorer la spécificité dans ce cadre particulier et dans d'autres situations présentant des anomalies des protéines de liaison. Cependant, la composition exacte des méthodes actuelles reste brevetée. Il est difficile pour les fabricants d'obtenir des échantillons correctement identifiés de tels malades pour tester leurs méthodes de façon rigoureuse. Dans une étude comparative récente de méthodes de dosage de T4L une différence marquée a été constatée au septième jour après transplantation de moelle osseuse chez des sujets euthyroïdiens soumis à une thérapie à base de plusieurs médicaments comprenant de l'héparine et des glucocorticoïdes (101). Dans cette étude, les concentrations de T4T étaient normales chez la plupart des sujets (95 %) et la TSH sérique était < 0,1 mUI/L dans approximativement la moitié d'entre eux. Cette situation était logique au vu de la thérapie à base de glucocorticoïdes. Cependant, autant de valeurs élevées que sub-normales de T4L ont été rapportées par différentes méthodes. Il est apparu que les valeurs de T4L élevées observées chez 20 à 40 % des patients dans certaines méthodes étaient probablement le résultat de l'effet *in vitro* de l'héparine I.V. discuté ci-dessus [3.B3(c)vii]. Par contraste, les méthodes par traceurs analogues qui sont influencées par la liaison du traceur à l'albumine donnaient des valeurs de T4L sub-normales chez 20-30 % de malades (101). De tels artéfacts de dosage de T4L produisent une discordance entre les résultats de T4L et de TSH, augmentant ainsi le risque d'un diagnostic erroné de thyrotoxicose ou d'hypothyroïdie

secondaire. Ces observations suggèrent que les dosages de T4T seraient plus fiables dans le cadre de maladies non thyroïdiennes critiques.

**(d) Validation des méthodes de T4.** Malheureusement, la plupart des méthodes de dosage des hormones libres font l'objet d'une évaluation inadéquate avant leur introduction pour usage clinique. Les fabricants étendent rarement la validation de leurs méthodes au-delà de l'étude de patients ambulatoires hypo- ou hyperthyroïdiens, femmes enceintes et une catégorie mal définie de "malades NTI/hospitalisés". Cependant, il n'y a aucun consensus quant aux meilleurs critères à utiliser pour évaluer ces méthodes de dosage de la T4 libre. Il est insuffisant de simplement démontrer qu'une nouvelle méthode peut faire la distinction entre valeurs d'hypothyroïdie, valeurs normales et d'hyperthyroïdie, et de montrer la comparabilité avec les méthodes existantes ; toute méthode d'évaluation des hormones libres satisfera à ces critères sans renseigner nécessairement sur la concentration physiologique réelle des hormones libres.

**Recommandation 16. Pour les fabricants : estimation de l'exactitude diagnostique des méthodes de dosage de la T4L**

- L'exactitude diagnostique de la méthode devrait être testée en utilisant des échantillons identifiés de patients ambulants avec des anomalies des protéines porteuses suivantes:
  - anomalies de la TBG (œstrogènes élevés, excès et déficit congénital de TBG)
  - hyperthyroxinémie dysalbuminémique familiale (FDH)
  - affinité de la transthyrétine (TTR) augmentée
  - auto-anticorps anti-T4 et anti-T3
  - facteur rhumatoïde
- Tester la méthode pour interférences avec des échantillons sériques normaux enrichis de concentrations pertinentes d'inhibiteurs habituels aux concentrations qui provoquent le déplacement des hormones des protéines liantes dans le sérum non dilué, effets qui disparaissent après dilution c.-à-d.:
  - furosémide 30 µM
  - acide disalicylique 300 µM
  - phénytoïne 75 µM
  - carbamazépine 8 µM
- Relever toutes les interférences connues avec l'importance et le sens des erreurs qui en résultent
- Documenter les effets *in vitro* de l'héparine sur la génération d'acides gras libres pendant l'incubation du dosage

Les nouvelles méthodes devraient être testées avec des échantillons cliniques identifiés, surtout avec ceux qui peuvent mettre en doute la validité du dosage. Une autre approche est de tester un critère particulier en manipulant les composants d'un échantillon de sérum normal (148). Qu'importe l'approche adoptée, les questions clés sont en rapport avec la similitude entre échantillons et étalons car toutes les méthodes sont généralement comparables. Les autres approches incluent le test de récupération quantitative de L-T4 ajoutée, ou la détermination des effets de la dilution du sérum, car une dilution de 100 fois d'un sérum " normal " cause théoriquement une réduction insignifiante (moins de 2 %) de la concentration de la T4L (94,152) (58,189). Ces approches cependant ne testent que la dépendance de la méthode aux protéines, c.-à-d. le degré de dépendance de la valeur T4 libre de la dissociation des hormones libres des formes liées (148). Il est prévisible que ces approches donnent une évaluation défavorable des méthodes qui impliquent une importante dilution de l'échantillon comparées aux méthodes qui minimisent la dilution de l'échantillon. Il n'y a aucune évidence cependant, pour certifier que ces approches reflètent l'exactitude diagnostique de la méthode quand utilisées pour évaluer des échantillons cliniques difficiles. Finalement, comme avec toute méthode diagnostique, la spécificité d'une méthode de la T4L ne deviendra évidente qu'après avoir testé un spectre complet d'échantillons d'individus avec et sans dysfonctionnement thyroïdien présentant des anomalies des protéines porteuses ou sous médications connues pour affecter la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques. Une interférence inattendue ne pourrait être notée qu'après un certain temps d'utilisation tels les effets du facteur rhumatoïde qui peuvent produire des estimations de T4 libre sérique faussement élevées (112). La fluorescence non spécifique due à la présence dans le sang de substances telles que les acides organiques chez des malades urémiques, peut être une autre cause d'interférence non spécifique (190).

L'approche préférée est de porter une attention particulière aux échantillons qui sont susceptibles de causer une interférence non spécifique dans le test (98). Idéalement, dans le cadre de patients ambulatoires, il faudrait inclure des échantillons qui présentent : a) des anomalies de la TBG (grossesse, contraception orale, excès et déficits congénitaux de TBG) ; b) une hyperthyroxinémie dysalbuminémique familiale (FDH) ; c) des auto-anticorps anti-T4 et anti-T3 ; d) des substances interférentes telles que le facteur rhumatoïde et e) un large spectre d'agents pharmacologiques. En situation hospitalière, trois classes de malades devraient être testés: a) malades sans dysfonctionnement thyroïdien mais avec une T4T basse ou élevée, dû à une NTI ; b) malades avec une hypothyroïdie avérée, associée à une NTI sévère et, c) malades avec une hyperthyroïdie avérée, associée à une NTI. Cependant, il est extrêmement difficile pour les fabricants d'obtenir des spécimens identifiés représentatifs de tous ces malades. Puisqu' aucun fabricant n'a testé sa méthode de façon adéquate chez des malades gravement atteints, il est difficile pour les cliniciens d'avoir confiance dans le fait que des résultats anormaux de T4L reflètent bien chez de tels malades un véritable dysfonctionnement thyroïdien plutôt qu'une NTI. Dès lors chez des malades hospitalisés suspects d'un dysfonctionnement thyroïdien, une combinaison de dosages de TSH sérique et de T4T peut fournir plus de renseignements que le seul dosage de T4L, à condition que la valeur de T4T soit interprétée en fonction du degré de sévérité de la maladie. Spécifiquement, une T4T basse dans les NTI est habituellement limitée à des cas sévères dans le cadre de soins intensifs. Une T4T basse en cas de maladie non critique devrait inciter à envisager un dysfonctionnement de l'hypophyse. Chez les malades ambulants, les dosages de la T4L sérique sont souvent, du point de vue diagnostique plus exacts qu'un dosage de T4T. Cependant, quand un résultat de T4L anormal ne correspond pas à l'image clinique ou quand il y a une discordance inexplicée entre TSH et T4L, il peut être nécessaire de demander un dosage de la T4T comme confirmation. Eventuellement, le laboratoire pourrait envoyer

l'échantillon à un laboratoire différent qui utilise une autre méthode de T4L ou à un laboratoire de référence qui peut exécuter un dosage de T4L basé sur une séparation physique, telle que dialyse à l'équilibre ou ultrafiltration.

**(e) Interférences dans les dosages thyroïdiens.** Idéalement, une méthode de dosage des hormones thyroïdiennes devrait être dépourvue d'interférence de tout composé, médicament ou substance endogène (ex : bilirubine) dans tous les échantillons, à toutes concentrations. Les études disponibles auprès des fabricants varient largement dans le nombre de composés étudiés et dans les concentrations testées. Habituellement le laboratoire ne peut détecter des interférences de manière " proactive " qu'à partir de la cohérence du rapport de T4L et de TSH. Si un seul dosage est effectué, une interférence est suspectée en premier lieu par le clinicien qui observe une incohérence entre la valeur rapportée et l'état clinique du malade. Les contrôles classiques du laboratoire par la vérification de l'identité de l'échantillon et un test de dilution, ne permettent pas toujours de détecter une interférence. Typiquement les interférences dans les dosages de T4T ou de T4L provoquent des valeurs anormales inappropriées en regard d'une TSH sérique normale (Tableau 1). Les interférences dans les tests immunologiques de compétition ou de non compétition entrent dans trois catégories: (i) problèmes de réactivité hétéro-spécifique, (ii) anticorps endogènes dirigés contre l'analyte, (iii) interactions médicamenteuses (191).

**(i) Réactivité hétéro-spécifique (Réaction croisée)**

Les problèmes de réactivité hétéro-spécifique résultent de l'incapacité de l'anticorps de faire la différence entre l'analyte et une molécule structurellement apparentée (192). Les dosages d'hormones thyroïdiennes sont moins sujets à ce type d'interférence que la TSH. Les anticorps anti-iodothyronine sont en effet sélectionnés pour leur spécificité au moyen de préparations purifiées. La disponibilité d'anticorps monoclonaux et polyclonaux purifiés pour leur affinité a réduit la réactivité hétéro-spécifique des tests de T4 et de T3 actuels à moins de 0,1% pour tous les précurseurs et métabolites iodés de L-T4. Des interférences dans le dosage de T3L par l'acide 3-3',5-triiodothyroacétique (TRIAc) et de D-T4 dans les dosages de T4L ont toutefois été rapportées (14,135).

**(ii) Auto-anticorps endogènes**

Les auto-anticorps endogènes anti-T4 et anti-T3 ont à plusieurs reprises été détectés dans le sérum de malades présentant des affections auto-immunes thyroïdiennes ainsi que non thyroïdiennes. En dépit de leur prévalence élevée, les interférences causées par de tels auto-anticorps sont relativement rares. Ces interférences sont caractérisées par des valeurs faussement basses ou élevées, selon le type et les composants du dosage utilisé (193).

**(iii) Interférences médicamenteuses**

Les interférences médicamenteuses *in vitro* peuvent résulter de la présence dans le sérum d'agents thérapeutiques ou diagnostiques à des concentrations suffisantes pour perturber les tests thyroïdiens (67,68). Les méthodes utilisant des signaux fluorescents peuvent être sensibles à la présence d'agents thérapeutiques ou diagnostiques fluorophores dans l'échantillon (190). Dans le cas d'administration I.V. d'héparine, l'activation *in vitro* de lipoprotéine-lipases peut générer des acides gras libres qui peuvent induire des valeurs faussement élevées de T4L [3.B3(c)vii] (84,97,98,100,101,167-170).

**(f) Intervalles de référence des valeurs normales de T4L et de T3L.** Les méthodes de séparation physique sont utilisées pour assigner des valeurs aux calibrateurs employés dans la

plupart des dosages de T4L. Il y a une concordance plus proche entre les intervalles de référence des diverses méthodes de dosage des hormones libres utilisées en biologie clinique qu'entre les diverses méthodes qui font appel à une séparation physique. Les intervalles de référence pour les méthodes par dosage immunologique de T4L sont proches de 9-23 pmol/L (0,7-1,8 ng/dL). Par contraste, les limites supérieures de T4L pour les méthodes telles que la dialyse à l'équilibre s'étendent au-delà de 30 pmol/L (2,5 ng/dL). Les intervalles de référence pour les méthodes immunologiques de T3L se situent entre 3,5-7,7 pmol/L (0,2-0,5 ng/dL). Les méthodes de dosage T3L avec séparation physique ne sont à l'heure actuelle disponibles que comme dosages effectués pour la recherche (102).

**(g) Standardisation ou calibration.** Au niveau international, il n'existe pas d'étalons standards ou de méthodes de référence pour les dosage d'hormones libres. Bien que des méthodes de référence aient été suggérées pour les dosages de T4T, il sera difficile d'adapter de telles méthodes pour les hormones libres (139). Chaque méthode et chaque fabricant approche le problème de standardisation uniquement dans sa propre perspective.

Les méthodes d'évaluation de la T4L qui exigent deux tests indépendants (dialyse à l'équilibre avec traceur et tests d'ultrafiltration ainsi que les méthodes par index) utilisent une mesure de l'hormone totale et de la fraction libre. Les dosages d'hormones totales sont standardisés grâce à des calibrateurs préparés par gravimétrie à partir de préparations hormonales de grande pureté et commercialement disponibles. La fraction libre est déterminée par une mesure de radioactivité (cpm) dans un dialysat ou un ultrafiltrat. Dans le cas des méthodes par calcul d'index, la saturation ou la capacité de liaison des protéines de transport est mesurée en utilisant un test déterminant un ratio de liaison des hormones thyroïdiennes (THBR), quelquefois repris comme test d'adsorption. Les tests THBR sont standardisés vis à vis de sérums avec des protéines liantes normales. Une valeur de 1,0 leur est assignée [3.B2(b)].

Une situation plus compliquée se rencontre dans le dosage des hormones libres. En général ces dosages sont fournis avec des étalons qui ont des valeurs d'hormones libres, connues ou assignées, déterminées par une méthode de référence (habituellement dialyse à l'équilibre avec RIA de T4L dans le dialysat). Cette démarche est classiquement exécutée par le fabricant dans le but d'établir des valeurs d'hormones libres pour les calibrateurs à base de sérum humain à inclure dans la trousse. Une approche alternative utilise la loi d'action de masse pour calculer la concentration d'hormones libres dans le cas d'hormones fortement liées, telles que la thyroxine, (194). La concentration d'hormones totales, un dosage de la capacité de liaison totale pour les hormones dans cet échantillon sérique, et la constante d'équilibre fournissent les renseignements nécessaires pour calculer la concentration de l'hormone libre. Cette approche est valable pour les calibrateurs et les contrôles fabriqués à partir de sérum humain contenant de la TBG à capacité de liaison normale. Cela permet au fabricant de faire des calibrateurs et des contrôles de niveaux fixes.

L'usage de calibrateurs, préparés comme décrits ci-dessus, permet de compenser l'extraction excessive d'hormones de leurs protéines liantes. Spécifiquement, dans le cas de la thyroxine et de la triiodothyronine, l'anticorps dans la trousse lie les hormones libres, et extrait une quantité significative (~ 1-2 %) d'hormones liées. Dosée directement, la concentration d'hormones libres, due à l'extraction excessive serait anormalement élevée. Cependant, l'usage de calibrateurs de niveaux d'hormones libres connus et préparés dans du sérum humain permet d'affecter des valeurs au signal du système de lecture du dosage (isotopique, enzymatique, fluorescent ou chimiluminescent) correspondant aux concentrations d'hormones libres connues. Toutefois, cette approche n'est valable que si le pourcentage d'hormones extrait du calibrateur est identique à celui de l'échantillon. Ceci est rarement le cas pour des

échantillons qui contiennent des anomalies des protéines porteuses (ex : TBG congénitale élevée et abaissée, FDH,NTI, etc...).

#### **4. Le dosage des hormones libres : le futur**

L'époque des dosages immunologiques pour la quantification des hormones thyroïdiennes et stéroïdes dans les fluides biologiques a débuté dans les années 70. Cette époque touche à sa fin. L'application de spectrométrie de masse au dosage des hormones dans les fluides biologiques émerge progressivement (138). Il n'y a aucun doute que la spectrométrie de masse fournira une meilleure quantification grâce à une plus grande spécificité analytique et à moins d'interférences analytiques que dans les dosages immunologiques. Pour l'instant, de telles techniques n'ont été appliquées que pour doser la T4T (139). Cependant, l'exigence d'une libération complète des hormones du complexe hormones/protéines restera incontournable pour les dosages d'hormones totales. Pour les dosages d'hormones libres, l'exigence d'une séparation physique, entre hormones libres et liées, avant quantification restera également maintenue. Pour réaliser cette dernière, une nouvelle technologie de séparation sera nécessaire, avant qu'une méthode ne puisse être considérée comme une référence. La dilution implicite de petites molécules est une limitation de la dialyse à l'équilibre qui doit être solutionnée. L'ultrafiltration se montre prometteuse, mais les méthodes actuelles présentent des difficultés techniques et sont peu praticables pour cette tâche. La qualité des mesures par spectrométrie de masse d'hormones liées à des protéines sériques sera directement dépendante des étapes de préparation de l'échantillon à doser. Néanmoins la méthode de référence idéale de dosage des hormones libres serait une technique qui fait appel d'une part à l'ultrafiltration à 37°C, pour éviter les effets de la dilution et d'autre part à la mesure directe des hormones libres dans l'ultrafiltrat par spectrométrie de masse.

#### **Recommandation 17. Pour les laboratoires réalisant des dosages de T4L et de T3L**

- Les cliniciens devraient avoir un accès aisé aux renseignements sur les effets de médicaments et l'exactitude diagnostique du test utilisé pour évaluer l'état thyroïdien de patients avec diverses anomalies des protéines porteuses et celui de malades sévèrement atteints.
- En cas de demande du clinicien, le biologiste devrait être à même de confirmer un résultat mis en question en exécutant une mesure des hormones totales ou une vérification de la T4L par une méthode de référence dans laquelle les hormones libres et liées sont physiquement séparées, telle que la dialyse à l'équilibre directe ou ultrafiltration.
- Des résultats mis en question devraient faire l'objet, pour vérification, d'une recherche d'interférences en répétant le dosage avec une méthode différente (Envoi à un laboratoire différent si nécessaire.)

### 3. C. Thyrotropine ou Thyroid Stimulating Hormone (TSH)

Depuis plus de 25 ans, les dosages de TSH sont capables de détecter des augmentations des taux sériques caractéristiques de l'hypothyroïdie primaire. Par leur sensibilité accrue, ces méthodes peuvent aujourd'hui, aussi, détecter des valeurs basses typiques de l'hyperthyroïdie. Ces nouvelles techniques sont le plus souvent des méthodes immuno-métriques non isotopiques adaptées sur automates d'immuno-analyse. Ces dosages atteignent pour la plupart une sensibilité fonctionnelle (SeF) de 0,02 mUI/L ou moins, ce qui est la limite de détection nécessaire pour couvrir toute la zone de mesure de TSH rencontré de l'hypo- à l'hyperthyroïdie. Avec cette sensibilité, il est possible de mieux quantifier les états de thyrotoxicose (en distinguant les hyperthyroïdies sévères à TSH < 0,01 mUI/L, des hyperthyroïdies frustes ou sub-cliniques dont la TSH reste comprise entre 0,01 et 0,1 mUI/L), de mieux suivre la récupération hypophysaire lors du traitement de ces hyperthyroïdies, de mieux adapter les traitements freinateurs, de suivre les patients hospitalisés en mauvais état général (nonthyroidal illness ou NTI).

En quelques années, l'augmentation de la sensibilité des dosages de TSH a modifié la stratégie diagnostique des dysfonctions thyroïdiens. Il est actuellement admis que le dosage de TSH est un test plus sensible que celui de la mesure de T4L pour détecter une hypo- et une hyperthyroïdie. Pour diagnostiquer une dysfonction thyroïdienne, de nombreux pays recommandent le dosage de TSH seul, pour les patients ambulatoires (à condition que la SeF du dosage soit < 0,02 mUI/L, ce qui est la caractéristique des dosages de troisième génération). L'approche par les dosages de TSH et T4L est préférée lorsque l'axe hypothalamo-hypophysaire n'est pas intègre, lors d'hypo- ou d'hyperthyroïdie d'origine centrale [3.C4 (f)]: tumeurs hypophysaires sécrétant de la TSH [3.C4 (g)], états de résistance aux hormones thyroïdiennes. Certaines interférences ou situations exceptionnelles peuvent être repérées par des discordances dans le rapport TSH/T4L, ce que ne permet pas le seul dosage de TSH (Tableau 1).

#### 1. Spécificité

**(a) Hétérogénéité de la molécule de TSH.** Dans le sang, la TSH est une molécule hétérogène qui présente différentes isoformes circulantes. Ces isoformes sont aussi présentes au niveau hypophysaire. Actuellement les standards, utilisés dans les dosages, proviennent d'extraits hypophysaires (Conseil de la Recherche Médicale MRC 80/558). Ils pourraient être dans le futur, remplacés par des préparations de TSH humaine recombinante qui serviraient de standards primaires. Les méthodes immuno-métriques actuelles utilisent des anticorps monoclonaux anti-TSH qui ne croisent plus avec les autres hormones glycoprotéiques. Ces dosages peuvent cependant détecter des isoformes de TSH anormales sécrétées soit par des sujets euthyroïdiens, soit par des patients présentant des pathologies hypophysaires et induire des taux de TSH paradoxalement normaux et même élevés pour la majorité des méthodes (195, 197,199). Par exemple, au cours d'une hypothyroïdie centrale, des isoformes de TSH anormalement glycosylées et à activité biologique réduite sont sécrétées. De même une tumeur hypophysaire sécrétant des isoformes de TSH à activité biologique exacerbée peut donner des concentrations de TSH sérique paradoxalement normale chez des sujets dont la thyroïde est hyperfonctionnelle.

**(b) Problèmes techniques.** Les élévations de TSH artéfactuelles peuvent être dues à des étapes de lavage/rinçage mal réalisées (202), à des anticorps hétérophiles (HAMA) qui jouent le rôle de pont entre les anticorps du dosage et créent un signal positif erroné [2.C3] (202,203).

**(c) Détection des interférences dans un dosage de TSH.** Le traditionnel test de dilution ne permet pas de détecter toutes les interférences. Le meilleur moyen, lorsque l'on recherche une interférence, est de vérifier le résultat par un dosage d'un autre fabricant. Quand le résultat varie de plus de 50 %, c'est qu'il existe une interférence.

Devant un taux de TSH anormalement bas, une épreuve de stimulation par la TRH (200 µg I.V.) peut être utile ; devant un taux de TSH anormalement élevé c'est un test de freinage qui sera réalisé (1 mg de L-T4 ou 200 µg de L-T3 *per os*). Pour des sujets normaux, l'épreuve de stimulation doit accroître le taux de TSH d'au moins 4 mUI/L. Lors d'une épreuve de freinage, il doit décroître de 90 % en 48 heures.

### **Recommandation 18. Investigation des valeurs sériques de TSH discordantes chez des patients ambulatoires**

*Une valeur de TSH discordante pour un patient ambulatoire, en état de stabilité thyroïdienne, peut être une erreur technique. La perte de spécificité peut résulter : d'une erreur de laboratoire, de substances interférentes (anticorps hétérophiles), ou de l'existence d'isoformes inhabituelles de TSH (Recommandation 7 et Tableau 1). Les cliniciens peuvent demander à leur laboratoire les vérifications suivantes :*

- Confirmer l'identité du prélèvement (éliminer une substitution d'échantillon)
- Quand le taux de TSH est élevé de façon inattendue, demander de diluer l'échantillon de préférence dans un sérum thyrotoxique pour vérifier le parallélisme
- Demander de doser l'échantillon par une autre méthode (fabricant différent, envoi à un autre laboratoire si nécessaire). Si la variabilité du résultat est > à 50%, une substance interférente peut-être présente
- Lorsque les différents problèmes techniques ont été éliminés, des aides peuvent être apportées par les tests biologiques :
  - pour vérification d'une TSH basse discordante, réalisation d'un test de stimulation par le TRH. On attend une multiplication par 2 du taux de TSH pour une réponse normale (augmentation 4,0 mUI/L)
  - pour vérification d'une TSH élevée discordante, réalisation d'un test de freinage par les hormones thyroïdiennes. Une réponse normale à 1 mg de L-T4 ou 200 µg L-T3 *per os* induira une diminution de plus de 90 % du taux de TSH en 48 heures.

## 2. Sensibilité

Historiquement, la « qualité » d'une méthode de dosage de TSH sérique a été déterminée par un repère clinique. Le dosage est capable de discriminer les taux euthyroïdiens (0,4 à 4 mUI/L) des taux effondrés de TSH rencontrés dans les thyrotoxicoses franches liées à la maladie de Basedow (< 0,01 mUI/L). La plupart des méthodes de TSH ont une limite de détection inférieure ou égale à 0,02 mUI/l (dosage de troisième génération).

### **Recommandation 19. Définition de la sensibilité fonctionnelle**

*La sensibilité fonctionnelle doit être utilisée pour déterminer la limite de détection la plus faible du dosage.*

- La sensibilité fonctionnelle du dosage de TSH est définie pour un coefficient de variation inter-séries de 20 % déterminé par le protocole recommandé (Recommandation 20)

Les fabricants ont, en général, abandonné l'utilisation de la « sensibilité analytique » calculée à partir de la précision intra-essai du calibrateur zéro, lequel ne reflète pas la sensibilité d'un test en pratique clinique (126, 127). A la place, c'est le paramètre de sensibilité fonctionnelle qui a été adopté (202). La sensibilité fonctionnelle est calculée pour un coefficient de variation inter-séries du dosage de 20 % et elle est utilisée pour établir la limite la plus faible se rapportant au test (202).

### **Recommandation 20. Protocole pour déterminer la sensibilité fonctionnelle et la précision inter-séries d'un dosage de TSH**

*La sensibilité fonctionnelle du dosage de TSH est définie par la mesure, au moins 10 fois, de pools de sérums humains couvrant la gamme de mesure du dosage. La valeur du pool le plus bas doit être 10 % au-dessus de la limite de détection et la valeur du pool le plus élevé à 90 % de la limite supérieure de mesure.*

- La contamination croisée doit être testée par mesure du pool à concentration la plus faible juste après le pool à concentration la plus élevée
- Utilisez le même test pour les pools et les sérums de patients (c'est-à-dire en simple ou en double)

- L'opérateur de l'automate doit ignorer l'utilisation de pools de sérum comme contrôle
- Les contrôles des dosages de TSH doivent être espacés dans un intervalle représentatif de la pratique clinique (c'est-à-dire 6 à 8 semaines pour des patients en ambulatoire)
- Utilisez au moins 2 lots différents de réactifs et deux lots différents de calibrateurs pendant la période de contrôle
- Si on utilise le même kit de dosage sur deux automates différents, des contrôles doivent être réalisés périodiquement et en aveugle pour s'assurer de la corrélation entre les résultats obtenus avec chacun des automates.

La sensibilité fonctionnelle doit être déterminée en suivant strictement le protocole recommandé (Recommandation 20). Le protocole est conçu pour déterminer, avec réalisme, la limite de détection minimale du dosage en pratique clinique et prendre en considération différents facteurs susceptibles d'influencer l'imprécision du dosage avec un retentissement en pratique clinique. Ces facteurs sont:

- la différence de matrice entre le sérum du patient et le diluant du standard
- la diminution de la précision au cours du temps
- la variabilité inter-lots des réactifs fournis par le fabricant
- des différences de calibration entre les automates et les opérateurs techniques
- la contamination de sérum à taux bas par un sérum à taux élevé

#### **Recommandation 21. Pour les laboratoires réalisant des dosages de TSH**

*La sensibilité fonctionnelle est le critère de performance le plus important dans le choix d'un dosage de TSH. Les facteurs pratiques comme l'instrumentation, les temps d'incubation, le coût, l'assistance technique bien qu'importants constituent des considérations secondaires. Les laboratoires devraient utiliser des intervalles de calibration qui optimisent la sensibilité fonctionnelle, même si la recalibration doit être plus fréquente qu'il n'est recommandé par le fabricant*

- Sélectionner un dosage de TSH ayant une sensibilité fonctionnelle inférieure ou égale à 0,02 mUI/L
- Etablir la sensibilité fonctionnelle, en suivant la Recommandation 20, indépendamment de celle du fournisseur
- Il n'y a pas de justification scientifique à utiliser un dosage moins sensible plutôt qu'un dosage plus sensible (le manque de sensibilité a pour conséquence des valeurs faussement élevées, pas faussement basses)

L'utilisation de la sensibilité fonctionnelle comme la limite de détection minimale est une approche conservatoire pour s'assurer que tout résultat de TSH correspond à une détectabilité réelle. De plus, le coefficient de variation inter-séries de 20 % approche l'imprécision maximale admise pour un test diagnostique (Tableau 5).

### 3. Intervalles de référence pour la TSH

En dépit de différences modestes en rapport avec l'âge, le sexe, l'appartenance ethnique révélées dans l'enquête NHANES III US, il n'apparaît pas nécessaire, en pratique clinique, d'ajuster l'intervalle de référence pour ces facteurs (18). Les taux de TSH sérique montrent une variation diurne, avec un pic survenant la nuit et le nadir, qui représente approximativement 50 % de la valeur du pic, survenant entre 10 et 16 H (123, 124). Les variations biologiques ne doivent pas influencer l'interprétation diagnostique d'un dosage de TSH, étant donnée que dans leur majorité les prélèvements sont réalisés pour des patients en ambulatoire entre 8 et 18 heures et que les intervalles de référence de TSH sont, le plus souvent, établis à partir d'échantillons collectés pendant cette période. Les intervalles de référence de la TSH sérique doivent être établis à partir d'échantillons provenant de sujets euthyroïdiens, ambulatoires, sans anticorps anti-thyroperoxydase, sans dysfonction thyroïdienne personnelle ou familiale et sans goitre visible. La variation des intervalles de référence d'une méthode à une autre peut refléter les différences dans la reconnaissance épitopique des anticorps utilisés dans les différents kits mais aussi un manque de rigueur dans la sélection des sujets considérés comme normaux.

#### **Recommandation 22. Intervalles de référence pour la TSH**

*Les intervalles de référence pour la TSH doivent être établis avec un intervalle de confiance à 95 % venant de la transformation logarithmique des valeurs de TSH d'au moins 120 volontaires normaux, euthyroïdiens rigoureusement choisis et qui n'ont :*

- Aucun anticorps anti-thyroïdien détectable : pas d'anticorps anti-thyroperoxydase ou d'anticorps anti-thyroglobuline (mesurés par un immuno-dosage sensible)
- Aucun passé de dysfonction thyroïdienne personnel ou familial
- Aucun goitre visible ou palpable
- Aucune médication (sauf les oestrogènes)

La distribution des concentrations de TSH sérique déterminée chez les sujets normaux euthyroïdiens révèle une « queue » vers les valeurs les plus hautes. La transformation logarithmique de ces valeurs donne une répartition normale qui permet de calculer l'intervalle de référence à 95 % (valeur moyenne de la population typique : 1,5 mUI/L, plage de référence : 0,4 à 4 mUI/L dans les populations à apport iodé suffisant) (202, 206). Cependant,

étant donnée la prévalence élevée d'hypothyroïdie sub-clinique de la population générale, il est possible que la limite supérieure actuelle de la plage de référence soit influencée par l'inclusion de personnes ayant une dysfonction thyroïdienne occulte (18).

**(a) Limites supérieures de référence pour la TSH.** Ces deux dernières décennies, la limite supérieure de l'intervalle de référence pour la TSH a décliné régulièrement de 10 à 4,0–4,5 mUI/L. Cette diminution reflète plusieurs facteurs y compris l'amélioration de la sensibilité et des spécificités des anticorps monoclonaux utilisés dans les dosages immuno-métriques, la reconnaissance de la distribution normale des valeurs logarithmiques des taux de TSH, et cela est important, les améliorations des sensibilité et spécificité des tests de recherche des anticorps anti-thyroïdiens utilisés en pré-tri des sujets.

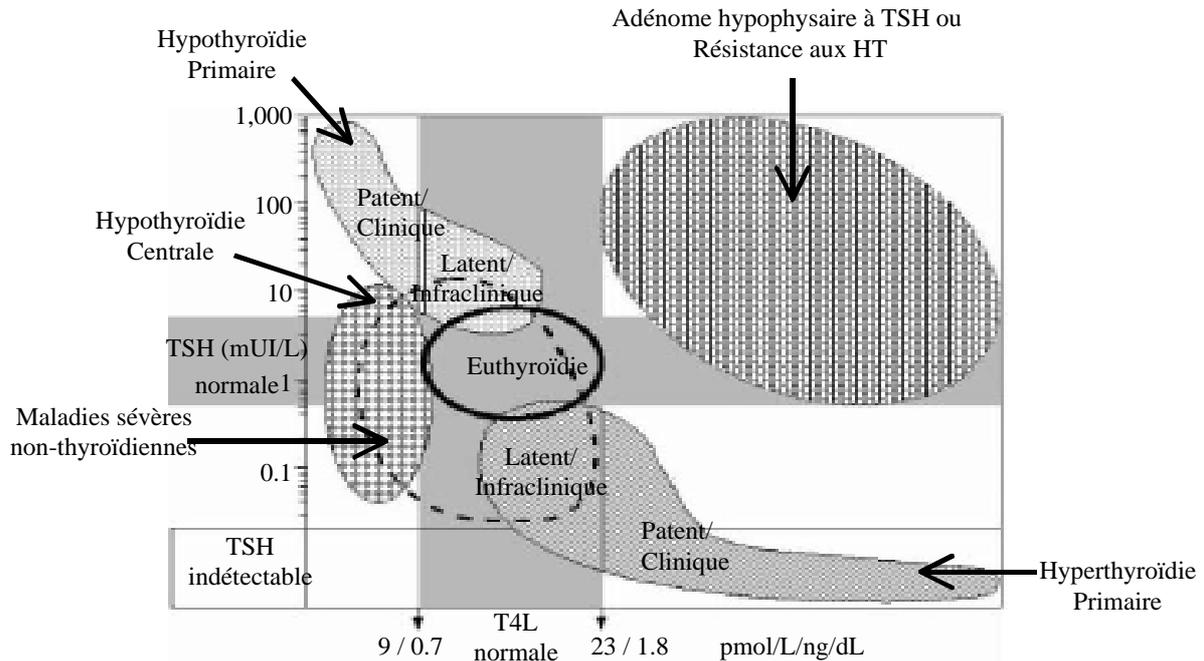
L'étude récente de suivi de la cohorte Whickham a trouvé que les sujets avec une TSH sérique  $> 2$  mUI/L lors de leur première évaluation ont eu une probabilité plus élevée de développer une hypothyroïdie pendant les vingt prochaines années surtout si les anticorps anti-thyroïdiens étaient élevés (35). Cette augmentation de probabilité a été aussi observée pour les sujets négatifs en anticorps. Il est probable que de tels sujets avaient des taux faibles d'anticorps anti-thyroïdiens, mais ceux-ci n'étaient pas détectés alors par la méthode peu sensible par agglutination de recherche des anticorps anti-microsomaux (207). Même les dosages actuels sensibles d'anticorps anti-thyroperoxydase peuvent ne pas identifier tous les individus présentant une insuffisance thyroïdienne occulte. Dans le futur, il est probable que la limite supérieure du domaine de référence normal pour la TSH serait réduite à 2,5 mUI/L parce que l'intervalle de référence à 95 % des volontaires normaux, rigoureusement sélectionnés, ont des valeurs de TSH, dans le sérum, comprises entre 0,4 et 2,5 mUI/L.

**(b) Limites inférieures de référence de TSH.** Avant l'ère des dosages immuno-métriques, les dosages de TSH étaient trop peu sensibles pour détecter les valeurs les plus basses du domaine de référence (209). Les méthodes actuelles sont capables de mesurer des TSH entre 0,2 et 0,4 mUI/L (202). Comme la sensibilité fonctionnelle de ces méthodes a été améliorée, il y a eu un intérêt croissant à définir la vraie limite inférieure de la normalité pour déterminer l'existence clinique d'une hyperthyroïdie frustrée (sub-clinique). Les études actuelles suggèrent que des valeurs de TSH dans la plage de normalité de 0,1 à 0,4 mUI/L peuvent représenter un excès en hormones thyroïdiennes et chez les patients âgés être associées à un risque accru de fibrillation auriculaire et de mortalité cardio-vasculaire (36, 37). Il est donc important d'exclure des sujets avec goitre et toute pathologie de la cohorte normale sélectionnée pour l'étude des valeurs de référence.

#### 4. Utilisation clinique des dosages sériques de TSH

**(a) Dépistage de dysfonctions thyroïdiennes chez les patients ambulatoires.** Lors de la recherche de dysfonctions thyroïdiennes chez les sujets ambulatoires, la plupart des sociétés savantes médicales recommandent l'utilisation d'un dosage de TSH ayant une sensibilité fonctionnelle inférieure ou égale à 0,02 mUI/L (4, 10, 210). La spécification de la sensibilité du dosage est essentielle à la détection fiable de valeurs infra-normales. Des dosages moins sensibles de TSH sont enclins à produire des résultats faussement négatifs (plage normale) pour des échantillons avec des taux de TSH sub-normaux (202). La relation log-linéaire entre les concentrations de TSH et T4L impose la préférence à la détermination de la TSH qui seule peut détecter des excès ou des déficits minimes en hormones thyroïdiennes (Fig.4)[2.A1]. Un dysfonctionnement thyroïdien frustré (sub-clinique), caractérisé par un taux de TSH anormal associé à une concentration de T4L dans les limites de la normale est rapporté, dans des

études de population, avec une prévalence à 10 % et 2 % respectivement pour les hypo- et les hyperthyroïdies subcliniques (10, 18, 25, 211).



**Figure 4. Relation entre les concentrations en TSH et en T4 libre dans différentes situations cliniques.**

Malgré la sensibilité clinique du dosage de TSH, une stratégie centrée sur le seul dosage de TSH a intrinsèquement deux limitations primaires. En premier, elle suppose que la fonction hypothalamo-hypophysaire est intacte et normale. En second, elle suppose que l'état thyroïdien des patients est stable, c'est-à-dire que le patient n'a pris aucune thérapie récente pour hypo- ou hyperthyroïdie [D.2 A], (Fig. 2) (19). Si l'un ou l'autre de ces critères n'est pas rempli, les résultats de la TSH sérique peuvent conduire à un diagnostic erroné (Tableau 1).

Quand on recherche la cause d'un taux de TSH anormal en présence de taux de formes libres de T3 et de T4 normaux, il est important de prendre en compte la labilité du taux de la TSH, sujette à des influences pituitaires, donc non thyroïdiennes (glucocorticoïdes, somatostatine, dopamine, etc.) qui peuvent perturber la relation TSH/T4L (69, 70, 71, 212). Il est important de confirmer toute valeur anormale de TSH par un nouveau prélèvement effectué trois semaines plus tard avant de retenir un diagnostic de dysfonctionnement thyroïdien frustré (sub-clinique). Après avoir confirmé une anomalie importante du taux de TSH, il est utile d'en rechercher l'étiologie par la mise en évidence d'anticorps anti-thyroperoxydase qui prouveront l'existence d'une auto-immunité thyroïdienne. La rapidité de développement d'une pathologie thyroïdienne est proportionnelle à l'élévation du taux d'anticorps anti-thyroperoxydase. Après la confirmation d'un taux de TSH anormalement bas, il peut être difficile d'établir de manière univoque un diagnostic d'hyperthyroïdie sub-clinique surtout si le patient est âgé et ne reçoit pas de thérapie par la L-T4 (34). Si un goitre multi-nodulaire est présent, l'autonomisation thyroïdienne est une cause possible d'hyperthyroïdie sub-clinique (213).

Il n'y a pas de consensus en ce qui concerne l'âge optimal pour commencer le dépistage. L'American Thyroid Association recommande le dépistage à partir de 35 ans et tous les 5 ans ensuite (10). L'analyse décisionnelle paraît conforter l'efficacité de cette stratégie, en particulier pour les femmes (215). La stratégie d'utilisation du dosage de TSH pour dépister les hypo- et les hyperthyroïdies sub-cliniques restera en discussion jusqu'à un accord plus large sur les conséquences cliniques et le devenir d'une TSH chroniquement anormale. Il est nécessaire aussi de trouver un accord sur le taux de TSH à atteindre pour la mise en place d'un traitement (216, 217).

Il y a de plus en plus d'évidence que, des patients présentant une anomalie persistante de la concentration de TSH, s'ils sont laissés sans traitement, soient exposés à un plus grand risque. Une étude récente a rapporté un taux plus élevé de mortalité cardio-vasculaire pour des patients présentant un taux bas persistant de TSH (37). Un nombre croissant de rapports indiquent que, l'hypothyroïdie frustre, en début de grossesse, diminue les apports au fœtus et affaiblit le QI de la progéniture (63-65). De telles études prônent le dépistage précoce de la fonction thyroïdienne, en particulier chez les femmes en âge de procréer.

**(b) Patients âgés.** La plupart des études incitent au dépistage des dysfonctions thyroïdiennes chez les personnes âgées (10, 35, 214). La prévalence d'une TSH basse ou haute (associée à une T4L normale) est augmentée pendant la vieillesse par comparaison à des patients plus jeunes. La thyroïdite auto-immune, associant un taux de TSH élevé et des anticorps anti-thyroperoxydase détectables, est rencontrée avec une prévalence croissant avec l'âge (35). L'incidence d'un taux de TSH bas est aussi accrue chez les personnes âgées (35). Une concentration de TSH basse peut être transitoire mais être persistante pour approximativement 2 % des personnes âgées sans autre évidence de dysfonction thyroïdienne (36, 214). Ceci pourrait être dû à une modification du thyroïdostat T4L/TSH, à une modification de la bio-activité de la TSH ou à un léger excès d'hormones thyroïdiennes (218). Une étude récente de Parle et coll. a montré un taux de mortalité cardio-vasculaire plus élevé chez de tels malades (37) Le goitre multi-nodulaire constitue une étiologie à reconnaître, en particulier, dans des régions de carence en iode (213). Les prises médicamenteuses antérieures doivent être connues (y compris les prises de préparations en vente libre dont quelques unes contiennent de la T3). S'il n'y a pas de goitre, ni de prise médicamenteuse particulière, le taux de TSH sérique doit être réévalué avec recherche d'anticorps anti-thyroperoxydase 4 à 6 semaines plus tard. Si le taux de TSH reste bas et que la recherche d'anticorps anti-thyroperoxydase est positive, il faut considérer la possibilité d'une dysfonction thyroïdienne d'origine auto-immune. Le traitement devra être envisagé au cas par cas.

**(c) Thérapie substitutive par de la thyroxine L-T4.** Il est maintenant bien admis que les patients hypothyroïdiens ont des concentrations de T4L dans le 1/3 supérieur des valeurs de référence quand le traitement substitutif par la L-T4 a amené le taux de TSH dans la zone thérapeutique (entre 0,5 et 2 mUI/L) (219, 220).

La levothyroxine (L-T4) est la médication substitutive préférée pour l'hypothyroïdie. L'état d'euthyroïdie est habituellement atteint chez l'adulte avec une dose de 1,6 µg/kg/jour. Les enfants ont besoin de doses plus élevées (jusqu'à 4 µg/kg/jour) et les personnes plus âgées de doses plus faibles (1 µg/kg/jour). La dose initiale et le temps optimum pour établir la substitution complète doivent être individualisés en fonction de l'âge, du poids et du statut cardiaque. Les besoins en thyroxine sont augmentés pendant la grossesse [2.A3] et en période post-ménopausique pour les femmes débutant un traitement hormonal substitutif (223).

**Recommandation 23. Thérapie substitutive par la L-T4 de l'hypothyroïdie primaire**

- La L-T4, et non plus les extraits de thyroïde desséchée, est la médication préférée pour la substitution au long terme de l'hypothyroïdie
- Un état d'euthyroïdie est habituellement atteint avec une dose moyenne de 1,6 µg/kg/jour. La dose initiale et le moment pour atteindre la substitution totale devraient être individualisés en fonction de l'âge, du poids et du statut cardiaque. Une dose initiale est habituellement de 25 à 50 µg/jour. La mesure du taux de TSH après six semaines indiquera la nécessité d'ajuster la dose par incréments de 25 – 50 µg.
- Les enfants ont besoin de doses de L-T4 plus élevées, jusqu'à 4 µg/kg/jour du fait d'un métabolisme plus rapide. Les deux dosages de TSH et T4L doivent être réalisés et interprétés en utilisant des intervalles de référence spécifiques de l'âge et de la méthode (Tableau 3).
- Un taux de TSH compris entre 0,5 et 2 mUI/L est généralement considéré comme la zone thérapeutique optimale pour un traitement substitutif par la L-T4 de l'hypothyroïdie primaire
- A la suite d'un changement de posologie de L-T4, la TSH s'adapte lentement (Recommandation 2). Six à huit semaines sont nécessaires, après un ajustement thérapeutique, avant de réévaluer le taux de TSH
- Une compliance intermittente ou négative avec la thérapie de remplacement de levothyroxine (L-T4) donnera des valeurs de TSH et de T4L discordantes (TSH élevée/T4L élevée) à cause d'un état thyroïdien instable persistant (Recommandation 2). TSH et T4L devraient être utilisées pour surveiller de tels malades.
- Les besoins en thyroxine déclinent avec l'âge. Les individus âgés peuvent nécessiter moins de 1,0 µg/kg/jour et peuvent avoir besoin d'être dosés lentement. Certains cliniciens préfèrent doser ces malades progressivement. Une dose initiale de 25 µg est recommandée pour les malades avec des signes d'insuffisance coronarienne suivi par une augmentation de la dose de 25 µg toutes les 3-4 semaines jusqu'à la dose de substitution complète. Quelques-uns pensent qu'une valeur cible de TSH plus élevée (0,5-3,0 mUI/ml) peut-être appropriée pour les malades âgés.

- Pour une hypothyroïdie sévère, une charge initiale de L-T4 est le moyen le plus rapide pour retrouver un niveau thérapeutique de T4L parce que l'excès de sites de liaison inoccupés peut amoindrir la réponse T4L au traitement.
- Les besoins en thyroxine augmentent pendant la grossesse. L'état thyroïdien devrait être vérifié par TSH + T4L chaque trimestre de la grossesse. La dose de L-T4 devrait être augmentée (habituellement de 50 µg/jour) pour maintenir la TSH entre 0,5 et 2,0 mUI/L et une T4L dans le tiers supérieur de l'intervalle de référence normal.
- Les femmes commençant après leur ménopause une thérapie hormonale substitutive peuvent avoir besoin d'une augmentation de leur dose de L-T4 pour garder la TSH sérique dans la zone thérapeutique.
- Le contrôle de la TSH de malades qui reçoivent une dose de L-T4 stable est recommandé sur une base annuelle. Le meilleur moment pour le faire n'est pas influencé par le moment de la prise de L-T4 dans la journée
- Idéalement, la L-T4 devrait être prise avant de manger, toujours au même moment de la journée et au moins à 4 heures d'intervalle de tout autre médicament ou vitamine. La prise au coucher devrait être à 2 heures après le dernier repas.
- Les malades qui commencent une thérapie chronique avec cholestyramine, sulfate ferreux, carbonate de calcium, protéine de soja, sucralfate et anti-acide contenant de l'hydroxyde d'aluminium qui influence l'absorption de L-T4 peuvent nécessiter une dose de L-T4 plus importante pour maintenir la TSH dans la zone thérapeutique
- Les malades qui prennent de la rifampicine et des anti-convulsivants qui influence le métabolisme de la L-T4 peuvent aussi avoir besoin d'une dose de L-T4 augmentée pour maintenir la TSH dans la zone thérapeutique

Un taux de TSH sérique entre 0,5 et 2 mUI/L est généralement considéré comme la cible thérapeutique pour une dose thérapeutique standard lors du traitement d'une hypothyroïdie primaire.

Une concentration de T4L dans le tiers supérieur de l'intervalle de référence est la cible thérapeutique pour une thérapie par la L-T4 quand les patients souffrent d'hypothyroïdie centrale due à un dysfonctionnement pituitaire et/ou hypothalamique.

L'administration croissante de L-T4 par tranche de 25 µg chaque 6-8 semaines jusqu'à obtention de la substitution complète est le schéma classique. (TSH entre 0,5 et 2 mUI/L). Comme il est montré en Fig. 2, la TSH est lente à se rééquilibrer à un nouveau niveau de thyroxine. Les patients avec hypothyroïdie chronique sévère, peuvent développer une hyperplasie thyroïdienne hypophysaire pouvant mimer la présence d'un adénome hypophysaire, mais qui disparaît après plusieurs mois de thérapie substitutive par la L-T4 (224). Les malades qui prennent de la rifampicine et des anti-convulsivants, qui influencent le métabolisme de la L-T4, ont besoin d'une augmentation de la dose de L-T4 pour maintenir le taux de la TSH dans la zone d'efficacité thérapeutique.

Les dosages de T4 libre et TSH devraient être utilisés pour surveiller les patients hypothyroïdiens suspectés de mauvaise ou d'absence de compliance à leur thérapie par la L-T4. L'association paradoxale d'une T4L et d'une TSH élevées est souvent un signe de mauvaise compliance. Spécifiquement une ingestion importante de L-T4 avant une visite en clinique, élèvera la T4L mais manquera de normaliser le taux de TSH à cause de l'effet "temps de réponse" (Fig. 2). Par essence, la TSH sérique est l'analogue de l'hémoglobine A1c comme reflet du taux de T4 à long terme. Au moins six semaines sont nécessaires avant de redoser la TSH lors d'un changement de dose de L-T4 ou d'autre médication thyroïdienne. Le contrôle annuel de TSH chez les patients recevant une dose stable de L-T4 est recommandé.

Le moment de prélèvement pour ce contrôle n'est pas influencé par l'heure de la prise médicamenteuse (133). Cependant, on retardera la prise médicamenteuse lorsque le contrôle porte sur la T4L comme critère d'évaluation. La T4L sérique est augmentée de façon significative (13 %) au-dessus de la ligne de base pendant 9 heures après ingestion de la dernière dose (225).

Idéalement, la L-T4 devrait être prise avant de manger, toujours au même moment de la journée, et avec un intervalle d'au moins 4 heures avant toute autre prise médicamenteuse. Beaucoup de médicaments peuvent influencer l'absorption de la T4 (surtout colestyramine, sel de fer ou de calcium, protéines de soja, sucralfate, anti-acides qui contiennent de l'hydroxyde d'aluminium, anticonvulsivants ou rifampicine) (4, 226).

**(d)Thérapie freinatrice par la L-T4.** L'administration de L-T4 conçue pour amener les taux de TSH sérique à des valeurs sub-normales est réservée aux patients atteints de cancer thyroïdien bien différencié pour lequel la thyrotropine est considérée comme un facteur trophique (227). L'efficacité de la thérapie freinatrice par la L-T4 a été déterminée à partir d'études rétrospectives non contrôlées qui font ressortir des résultats contradictoires (228, 229).

Il est important d'individualiser le degré de freinage de la TSH en tenant compte de l'âge du patient, de son état clinique. Ceci inclut les facteurs de risque cardiaques, les facteurs de risque de récurrence de cancer différencié de la thyroïde face aux effets potentiellement délétères des états thyrotoxiques iatrogènes (sub-cliniques) sur le cœur et les os (36). En matière de cancer thyroïdien, de nombreux médecins ciblent une valeur de TSH comprise entre 0,05 et 0,1 mUI/L pour des patients à faible risque et une TSH < 0,01 mUI/L pour ceux qui sont à risque élevé. D'autres réduisent la dose de L-T4 pour obtenir des valeurs de TSH normales basses quand les patients ont un niveau de Tg indétectable et n'ont présenté aucune récurrence dans les 5-10 ans qui ont suivi la thyroïdectomie. La thérapie frénatrice, pour les goitres non endémiques, est généralement considérée comme inefficace (230). En outre, les patients avec goitres nodulaires présentent parfois des taux de TSH freinés dus à l'autonomisation de la glande thyroïde (213).

### **Recommandation 24. Thérapie frénatrice par la L-Thyroxine (L-T4)**

- La TSH est considérée comme un facteur de croissance potentiel pour le cancer différencié de la glande thyroïde. La dose de L-T4 classiquement utilisée pour freiner la TSH sérique, est de 2,1 µg/kg/jour pour les patients atteints de cancer.
- Le niveau cible du taux de TSH sérique, dans ce contexte, doit être individualisé par rapport à l'âge, à l'état clinique du patient, en tenant compte du statut cardiaque et des facteurs de risque de récurrence
- Beaucoup de médecins ciblent une valeur de TSH entre 0,05 et 0,1 mUI/L pour des patients à faible risque et une TSH < 0,01 mUI/L pour des patients à haut risque de récurrence.
- Certains ciblent la plage normale basse des normes de TSH, quand les patients présentent un taux de Tg sérique indétectable et aucune récurrence dans les 5-10 ans après thyroïdectomie.
- Si l'apport iodé est suffisant, la thérapie frénatrice par la L-T4 est rarement une stratégie de traitement efficace pour réduire les dimensions des goitres anciens et organisés.
- Avec le temps, les goitres multi-nodulaires développent typiquement une autonomie caractérisée par un taux sub-normal de TSH. Chez de tels patients, la TSH sérique devrait être vérifiée avant la mise sous thérapie frénatrice par L-T4.

**(e) Mesure de la TSH sérique chez les patients hospitalisés avec NTI.** En absence de pathologie thyroïdienne, des anomalies transitoires du taux de TSH, entre 0,02 et 20 mUI/L, sont communément rencontrées bien que la plupart des patients hospitalisés avec NTI présentent des concentrations de TSH dans les limites de la normale (20, 87, 92, 93). Lors de l'évaluation, par le dosage de TSH, d'un patient hospitalisé la valeur prévisionnelle positive de ce paramètre serait améliorée par utilisation d'une plage de référence allant de 0,02 à 10 mUI/L (20, 92, 93, 231). Si ces patients présentent des symptômes cliniques ou des antécédents de pathologie thyroïdienne, l'évaluation conjointe des concentrations de TSH et T4L (ou T4 totale) doit être réalisée (Recommandations 6 et 25).

En cas de prise de dopamine, ou de glucocorticoïdes, l'explication de l'anomalie de la TSH sera évidente (87, 92). Lorsqu'elle est due à une NTI, l'anomalie est parfois transitoire, elle se

réSORBE alors avec la guérison. Il est habituel de constater, pendant la phase aiguë de la maladie, un freinage transitoire mineur de la TSH entre 0,02 et 0,2 mUI/L. La récupération

entraînera un passage par des valeurs légèrement élevées (103). En milieu hospitalier, l'utilisation d'un dosage avec une sensibilité fonctionnelle inférieure ou égale à 0,02 mUI/L, déterminera de manière fiable le degré de freinage de la TSH. Des malades atteints d'hyperthyroïdie présenteront des taux de TSH indétectables ( $< 0,02$  mUI/L), ce qui permet de les différencier des patients en freinage léger transitoire du fait d'une NTI (20).

Diagnostiquer une hyperthyroïdie chez les patients atteints d'une NTI est problématique. Les méthodes actuelles de dosages de T4L peuvent fournir des valeurs inappropriées aussi bien basses que hautes chez des patients en euthyroïdie mais avec une NTI (101, 232). Le diagnostic d'hyperthyroïdie pourra être éventuellement confirmé par les mesures de T3T et T4T (Recommandation 6). Un taux de TSH  $< 0,02$  mUI/L est moins spécifique d'une hyperthyroïdie chez les patients hospitalisés que chez les sujets ambulatoires. Une étude a montré que 14 % des patients hospitalisés ayant un taux de TSH  $< 0,005$  mUI/L peuvent être euthyroïdiens. Lors de la stimulation par la TRH, ces malades présentent une réponse détectable de TSH alors que ceux, avec hyperthyroïdie et NTI, ne le font pas (20).

La fréquence élevée d'anomalies du taux de TSH en présence d'une NTI rend le diagnostic d'hypothyroïdie frustré (sub-clinique) difficile lors d'une hospitalisation. Les concentrations de T4L et T4T se situant dans les limites de la normale, aucune anomalie du taux de TSH (0,02 à 20 mUI/L), provenant d'une pathologie thyroïdienne sub-clinique, ne doit modifier la prise en charge lors de l'hospitalisation. Une réévaluation, 2-3 mois plus tard, sera réalisée. En revanche, les patients hypothyroïdiens présenteront l'association typique d'une élévation du taux de TSH ( $> 20$  mUI/L) et celle d'une concentration de T4L basse (92).

**Recommandation 25. Mesure de la TSH chez les patients hospitalisés**

- C'est la combinaison des dosages de TSH + T4L ou T4T qui est la plus performante pour rechercher une dysfonction thyroïdienne chez les patients hospitalisés
- L'intervalle de référence élargi de 0,05 à 10 mUI/L pour la TSH est le plus approprié dans le cadre hospitalier. Les taux de TSH peuvent devenir transitoirement sub-normaux, lors de la phase aiguë d'une maladie, puis s'élèveront lors de la phase de récupération.
- Un état d'euthyroïdie amènera un taux de TSH compris entre 0,05 et 10 mUI/L. Une anomalie thyroïdienne mineure sera détectée lors d'un re-dosage après amélioration de la pathologie (si les patients ne prennent pas de médication comme la dopamine qui inhibe directement la sécrétion de TSH par l'hypophyse)
- Un taux de TSH bas associé à une T4T et une T3T basses peuvent refléter une hypothyroïdie d'origine centrale consécutive à une maladie prolongée dont le traitement immédiat est actuellement controversé
- La recherche d'anticorps anti-thyroperoxydase contribue à la distinction entre une maladie thyroïdienne auto-immune et une NTI.

**(f) Hypothyroïdie centrale.** La relation logarithmique entre les taux de TSH et T4L impose qu'en cas d'hypothyroïdie primaire, une concentration de T4L infra-normale entraîne un taux de TSH  $> 10$  mUI/L (Fig. 1) [2.A]. Si le degré d'élévation de la TSH paraît faible au regard d'une T4L basse, on recherchera une insuffisance hypophysaire. La stratégie d'utilisation du dosage de TSH seul, en première intention, méconnaîtra un diagnostic d'hypothyroïdie centrale (19).

**Recommandation 26. Thérapie substitutive par la L-Thyroxine (L-T4) de l'hypothyroïdie centrale**

- Le traitement par la L-T4, d'une hypothyroïdie centrale due à une insuffisance hypophysaire ou hypothalamique, visera à amener le taux de T4L sérique dans le 1/3 supérieur de l'intervalle de référence
- Le critère d'évaluation thérapeutique du traitement d'une hypothyroïdie centrale est le dosage de T4L. Le jour de la mesure de la concentration de T4L, la prise journalière de L-T4 sera différée (pendant les 9 heures qui suivent l'ingestion de L-T4, la T4L augmente d'environ 13 % au-dessus du niveau basal).

Dans une hypothyroïdie centrale, en majorité, la concentration de TSH sera paradoxalement normale ou légèrement augmentée (29). Dans une étude de patients atteints d'hypothyroïdie centrale, 35 % présentaient des valeurs de TSH sub-normales mais 41 et 25 % avaient respectivement des valeurs inopportunistement normales ou élevées (233). Il est maintenant admis que ces taux élevés paradoxaux de TSH, constatés dans les hypothyroïdies centrales, sont causés par la mesure d'isoformes de TSH biologiquement inactives sécrétées par l'hypophyse malade ou en état de stimulation insuffisante par la TRH (197). Les anticorps monoclonaux, utilisés dans les dosages actuels de TSH, ne font pas de distinction entre les isoformes de TSH à activité biologique différente en raison de divers degrés de glycosylation, spécifiquement de sialylation de la molécule de TSH. Une sécrétion normale de TRH est indispensable pour induire la sialylation physiologique de la TSH, et l'association des deux sous-unités constituant la TSH mature biologiquement active (29, 197, 234). L'activité biologique de la TSH dans l'hypothyroïdie centrale apparaît inversement corrélée au degré de sialylation de la TSH aussi bien qu'au taux circulant de T4L (29). Le test de stimulation par la TRH peut être utile lors du diagnostic d'une hypothyroïdie centrale (235). Dans de telles conditions spécifiques, les réponses typiques de TSH sont émoussées (augmentation  $< 2$  fois la valeur basale, incrément  $\approx 4$  mUI/L) et peuvent être retardées (197, 204, 235, 236). De plus la réponse de la T3 à la TSH stimulée par la TRH est émoussée et correspond à l'activité biologique de la TSH (197, 237, 238).

**(g) Syndromes de sécrétion inappropriée de TSH.** Comme il est indiqué dans le Tableau 1, les anomalies des protéines de liaison, ou les problèmes techniques des dosages sont les

causes les plus fréquentes des discordances de la relation T4L-TSH. La dissociation apparemment paradoxale entre des taux élevés d'hormones thyroïdiennes et l'absence de suppression du taux de TSH a été dénommée « syndromes de sécrétion inappropriée de TSH ». La généralisation des dosages sensibles de TSH, capables de détecter de manière fiable les concentrations infra-normales, a permis leur identification de manière plus fréquente [3.C2].

**Recommandation 27. Utilité clinique des dosages de TSH (sensibilité fonctionnelle inférieure ou égale à 0,02 mUI/L)**

- La mesure du taux de TSH sérique est le test le plus sensible pour détecter une hypo- ou hyperthyroïdie sub-clinique comme une hypothyroïdie primaire patente chez les patients ambulatoires
- La majorité (> 95 %) des sujets euthyroïdiens, en bonne santé, ont une concentration de TSH sérique < 2,5 mUI/L. Pour les patients ambulatoires présentant un taux de TSH > 2,5 mUI/L, cette valeur doit être confirmée par une autre mesure réalisée 3-4 semaines plus tard. Ceci peut correspondre à un stade précoce d'une dysfonction thyroïdienne, surtout si des anticorps anti-thyroperoxydase sont détectés
- La mesure de la TSH sérique est le critère d'évaluation thérapeutique d'un traitement substitutif d'une hypothyroïdie primaire (Recommandation 23) et d'un traitement freinateur pour cancer différencié de la glande thyroïde (Recommandation 24)
- Les mesures de TSH sérique sont plus fiables que celles de T4L chez les patients hospitalisés avec NTI ne recevant pas de dopamine. Les deux tests TSH et T4L ou T4T doivent être réalisés chez les patients hospitalisés (Recommandations 6 et 26)
- La mesure de TSH ne peut être utile pour le diagnostic d'hypothyroïdie centrale car les dosages actuels de TSH mesurent des isoformes de TSH biologiquement inactives
- L'hypothyroïdie centrale est caractérisée par un taux de TSH inapproprié normal ou légèrement élevé et par une réponse émoussée à la stimulation par la TRH (élévation < 2 fois, incrément 4 mUI/L)
- Quand la T4L sérique est basse et que celle de TSH est modérément augmentée (< 10 mUI/L), un diagnostic d'hypothyroïdie centrale doit être envisagé
- Les mesures de TSH sérique sont des tests importants de dépistage en période pré-natale et pendant le premier trimestre de grossesse pour détecter une hypothyroïdie sub-clinique chez la mère (Recommandation 4)
- Dans le contexte d'un goitre multi-nodulaire, un taux de TSH bas suggère l'existence d'une hyperthyroïdie sub-clinique due à une autonomisation thyroïdienne
- Une mesure de TSH sérique est nécessaire pour confirmer qu'un taux élevé d'hormone thyroïdienne est dû à une hyperthyroïdie et pas à une anomalie de protéine de liaison (cf FDH)
- Une mesure de TSH sérique est le premier test à réaliser pour détecter une dysfonction thyroïdienne induite par l'amiodarone (Recommandation 5)

Comme il est montré dans le Tableau 1, il est essentiel d'exclure au préalable les causes possibles de rapport TSH/T4L discordant dû, par exemple, à une interférence technique et/ou anomalie de la protéine de liaison. Ces tests de confirmation doivent être exécutés sur un nouvel échantillon en mesurant la TSH et les hormones libres et totales par une méthode différente. C'est seulement après l'élimination des causes de discordance les plus classiques qu'il faut considérer les pathologies les plus rares comme l'existence d'une tumeur de l'hypophyse sécrétant de la TSH ou celle d'un état de résistance aux hormones thyroïdiennes. Quand le profil biochimique anormal a été confirmé, la possibilité qu'une tumeur pituitaire sécrétant de la TSH soit la cause du taux paradoxal de TSH doit être éliminée avant de conserver le diagnostic de résistance aux hormones thyroïdiennes. Il faut remarquer que ces deux conditions peuvent coexister (247). Des tumeurs pituitaires sécrétant de la TSH ont des profils biochimiques similaires à ceux des résistances aux hormones thyroïdiennes ; elles peuvent en être distinguées par le dosage de la sous-unité  $\beta$  et l'imagerie. De plus les tests dynamiques contribuent aussi au diagnostic. Spécifiquement, une réponse de TSH à la stimulation par la TRH et une absence de freinage par la T3, sont caractéristiques dans la plupart des cas de la résistance aux hormones thyroïdiennes (245).

(i) Tumeurs pituitaires sécrétant de la TSH. Les tumeurs pituitaires qui sécrètent de la TSH sont rares. Elles représentent moins de 1 % des cas de sécrétion inappropriée de TSH (27, 28). Ces tumeurs se présentent souvent sous la forme d'un macro-adénome associé à des symptômes d'hyperthyroïdie et à un taux de TSH sérique détectable. La mise en évidence de l'adénome hypophysaire est réalisée par RMN (28).

Après avoir exclu une raison technique d'élévation paradoxale de TSH (cf. HAMA), le diagnostic de tumeur pituitaire sécrétant de la TSH est habituellement retenu sur la base:

- d'un manque de réponse de la TSH au test de stimulation par la TRH,
- d'un taux élevé de sous-unité  $\beta$ ,
- d'un rapport élevé sous-unité  $\beta$  / TSH,
- de la mise en évidence d'un adénome hypophysaire par RMN.

(ii) Résistance aux hormones thyroïdiennes. La résistance aux hormones thyroïdiennes est habituellement due à une mutation du gène du récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) qui se produit 1 fois pour 50000 naissances (239–242). Bien que la présentation clinique puisse être variable, les patients présentent des profils biochimiques similaires. Spécifiquement, les concentrations de T4L et T3L sériques sont typiquement élevées (l'élévation pouvant être minime à 2–3 fois au-dessus de la norme supérieure de la normale) et sont associées à un taux de TSH dans les limites de la normale ou légèrement augmenté qui répond à la stimulation par la TRH. Cependant, il faut reconnaître que la sécrétion de TSH, n'est pas inappropriée, étant donné que la réponse du tissu à l'hormone thyroïdienne est réduite, nécessitant des taux élevés d'hormones thyroïdiennes pour maintenir un statut métabolique normal. Les patients présentant des états de résistance aux hormones thyroïdiennes ont typiquement un goitre résultant de l'hypersecrétion chronique d'isoformes de TSH hybride à haut potentiel biologique (199, 244). La manifestation clinique d'un excès en hormones thyroïdiennes couvre un large spectre. Quelques patients semblent avoir un métabolisme normal avec un taux de TSH proche de la normale et le déficit apparaît comme compensé par l'augmentation des taux d'hormones thyroïdiennes (résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes). D'autres patients apparaissent hyper-métaboliques du fait d'une résistance plus sélective de l'hypophyse (résistance pituitaire).

Les traits distinctifs de la résistance aux hormones thyroïdiennes sont la présence d'une TSH non freinée, avec une réponse appropriée à la TRH en dépit de taux d'hormones thyroïdiennes

élevées (242, 245). Bien que rare, ce diagnostic de résistance aux hormones thyroïdiennes n'est pas à méconnaître quand un patient présente des taux d'hormones thyroïdiennes élevés associés à une TSH paradoxalement normale ou élevée (242, 246). De tels malades ont souvent fait l'objet de diagnostics erronés et ont été soumis à une chirurgie thyroïdienne inappropriée ou à un traitement par l'iode radioactif (242).

### **Recommandation 28. Pour les fabricants de trousse de dosage de la TSH**

- Il est demandé aux fabricants qui commercialisent des kits de dosages de la TSH avec différentes sensibilités, l'arrêt de la commercialisation des produits moins sensibles
- Il n'y a pas de justification à indexer le prix des dosages de TSH sur la sensibilité !
- Il n'y a pas de justification scientifique à utiliser un test moins sensible plutôt qu'un test plus sensible
- Les fabricants devraient aider les laboratoires à établir, indépendamment, la sensibilité fonctionnelle en fournissant, si nécessaire, des pools de sérums humains à concentration basse en TSH
- Les fabricants doivent conseiller l'usage de préparations de calibrateurs, particulièrement si ces préparations sont variables d'un pays à l'autre
- Les fabricants doivent fournir le pourcentage de récupération de la préparation de référence de TSH à la concentration indiquée comme sensibilité fonctionnelle
- Les notices des kits devraient :
  - documenter la sensibilité fonctionnelle réelle de la méthode établie selon le protocole indiqué dans la Recommandation 20
  - citer la sensibilité fonctionnelle qui peut être atteinte par un ensemble de laboratoires cliniques utilisant le même kit
  - exposer le profil de précision inter-séries à atteindre dans un laboratoire clinique
  - recommander l'usage de la sensibilité fonctionnelle et non de la sensibilité analytique pour déterminer la limite la plus basse réalisable (la sensibilité analytique incite les laboratoires à adopter une limite de détection irréaliste)

### **3. D. Auto-anticorps anti-thyroïdiens dirigés contre la thyroperoxydase (TPOAb), la thyroglobuline (TgAb) et le récepteur de la TSH (TRAb)**

Les maladies auto-immunes thyroïdiennes (AITD) provoquent des dégâts cellulaires et modifient la fonction de la glande thyroïde par des mécanismes humoraux et cellulaires. Les dégâts cellulaires se produisent quand les lymphocytes T sensibilisés et/ou les auto-anticorps se fixent aux membranes des cellules thyroïdiennes provoquant des lyses cellulaires et des réactions inflammatoires. Des modifications dans la fonction de la glande thyroïde résultent de l'action d'auto-anticorps stimulants ou bloquants sur les récepteurs de la membrane cellulaire. Trois auto-antigènes thyroïdiens principaux sont impliqués dans les AITD. Il s'agit de la thyroperoxydase (TPO), la thyroglobuline (Tg) et le récepteur de la TSH. D'autres auto-antigènes, comme le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS) ont également été décrits, mais, pour l'instant, leur rôle diagnostique dans l'auto-immunité thyroïdienne n'a pas été établi (248). Les auto-anticorps anti-récepteurs de la TSH (TRAb) sont hétérogènes et peuvent imiter l'action de la TSH et provoquer une hyperthyroïdie, comme cela est observé dans la maladie de Basedow, ou, alternativement, empêcher l'action de la TSH et provoquer une hypothyroïdie. Cette dernière se produit plus particulièrement chez le nouveau-né à cause des anticorps anti-thyroïdiens apportés par la mère. Les anticorps anti-TPO (TPOAb) ont été impliqués dans les processus de destruction tissulaire associés à l'hypothyroïdie observée dans la thyroïdite de Hashimoto et les thyroïdites atrophiques. L'apparition des TPOAb précède habituellement le développement de dysfonctionnements thyroïdiens. Quelques études suggèrent que les TPOAb peuvent être cytotoxiques pour la thyroïde (249,250). Le rôle pathologique des TgAb reste incertain. Dans les régions riches en iode, les TgAb sont principalement recherchés en complément du dosage de la Tg sérique, parce que la présence des TgAb peut perturber le dosage de la Tg [3.E6]. Dans les régions carencées en iode (la France en est une, quoique faiblement), le dosage des TgAb peut être utile pour détecter les AITD chez les patients avec un goitre nodulaire et pour le suivi d'une thérapie à base d'iode pour goitre endémique.

Les tests de laboratoire qui déterminent les aspects cellulaires du processus auto-immun ne sont pas disponibles actuellement. Cependant, des dosages de la réponse humorale, c.-à-d. des auto-anticorps anti-thyroïdiens, peuvent être effectués dans la plupart des laboratoires cliniques. Malheureusement, l'utilité diagnostique et pronostique du dosage des auto-anticorps anti-thyroïdiens est gênée par des problèmes techniques qui sont discutés plus loin. Bien que les dosages des auto-anticorps soient utiles dans certaines situations cliniques, ils devraient être employés sélectivement.

#### **1. Signification clinique des auto-anticorps anti-thyroïdiens**

Les TPOAb et/ou les TgAb sont fréquemment présents dans le sérum des patients atteints de AITD (251). Cependant, occasionnellement, ces patients ont des tests négatifs en auto-anticorps anti-thyroïdiens. Des TRAb sont présents chez la plupart des patients ayant ou ayant eu une maladie de Basedow. Pendant la grossesse, la présence de TRAb est un facteur de risque de dysfonctionnement fœtal ou néonatal à cause du passage trans-placentaire des TRAb maternels (252,253). La prévalence d'auto-anticorps anti-thyroïdiens est augmentée quand les patients souffrent d'affections auto-immunes non-thyroïdiennes comme le diabète de type 1 ou l'anémie pernicieuse (254). Le vieillissement est aussi associé à l'apparition d'auto-anticorps anti-thyroïdiens (255). La signification clinique de taux faibles d'auto-anticorps anti-thyroïdiens chez des sujets euthyroïdiens reste encore inconnue (256). Cependant, des études longitudinales suggèrent que les TPOAb peuvent être un facteur de risque pour la survenue de

dysfonctionnements thyroïdiens comme la thyroïdite du post-partum (PPT) ainsi que pour le développement de complications auto-immunes dues à l'utilisation de divers agents thérapeutiques (50,257,258). Ceux-ci incluent l'amiodarone utilisé dans les cas de maladies cardiaques, l'interféron-alpha pour l'hépatite C chronique et le lithium pour les troubles psychiatriques (75,259-262). Le dosage des auto-anticorps anti-thyroïdiens n'est généralement pas recommandé pour suivre le traitement d'une AITD (263). Ce n'est pas surprenant puisque le traitement d'une AITD s'applique à la conséquence (dysfonctionnement thyroïdien) et non à la cause (auto-immunité) de la maladie. Cependant, des changements dans les concentrations d'auto-anticorps reflètent souvent un changement dans l'activité de la maladie.

## **2. Nomenclature des dosages des anticorps anti-thyroïdiens**

Les nomenclatures utilisées pour les auto-anticorps anti-thyroïdiens se sont multipliées, en particulier dans le cas des anticorps anti-récepteur de la TSH (LATS, TSI, TBII, TSH-R et TRAb). Les abréviations utilisées dans cette monographie, TgAb, TPOAb et TRAb sont celles qui sont recommandées internationalement. Ces abréviations correspondent aux entités moléculaires (immunoglobulines) qui reconnaissent les auto-antigènes indiqués dans les dosages de laboratoire. Des différences dans les dosages peuvent modifier la mesure de ces entités moléculaires, par exemple des dosages peuvent seulement détecter les IgG ou les IgG et les IgM ; les TPOAb ou les anticorps dirigés contre la TPO et d'autres auto-antigènes de membrane ; les TRAb inhibant la fixation de la TSH et/ou stimulant le récepteur de la TSH.

## **3. Spécificité des dosages des anticorps anti-thyroïdiens**

L'utilisation des dosages des auto-anticorps anti-thyroïdiens a été gênée par des problèmes de spécificité. Des études montrent que les résultats varient beaucoup selon le dosage utilisé. Ceci est dû à des différences dans la sensibilité et la spécificité des dosages et à l'absence de standardisation adéquate. Ces dernières années, des études ont montré qu'au niveau moléculaire, les auto-anticorps réagissent avec leurs auto-antigènes cibles, en se liant à des sites ou épitopes « conformationnels ». Le terme « conformationnel » fait référence à l'exigence d'une structure tri-dimensionnelle spécifique pour chacun des épitopes reconnus par les auto-anticorps. En conséquence, les résultats des dosages dépendent fortement de la structure moléculaire de l'antigène utilisé dans le test. De petits changements dans la structure d'un épitope donné peuvent se traduire par une baisse ou une perte dans la reconnaissance de l'auto-antigène par les anticorps dirigés contre cet épitope. Récemment, des anticorps anti-TGPO à spécificité double qui reconnaissent à la fois la Tg et la TPO ont été mis en évidence dans le sang de patients atteints de AITD (264).

### **Recommandation 29. Différences de sensibilité et de spécificité dans les dosages des anticorps anti-thyroïdiens**

- Reconnaître et comprendre que les résultats des dosages d'anticorps anti-thyroïdiens dépendent de la méthode de dosage utilisé.
- Les méthodes de dosages ne reconnaissent pas tous les paratopes parmi ceux qui sont présents dans les populations hétérogènes d'anticorps sériques.
- Les différences dans les dosages d'anticorps anti-thyroïdiens reflètent des différences dans les préparations d'antigènes, de récepteurs (dosages des récepteurs) ou de cellules (dosages biologiques) utilisées pour le dosage.
- Les différences dans les dosages peuvent provenir d'une contamination du réactif antigénique par d'autres auto-antigènes.
- Les différences dans les dosages peuvent provenir du principe de dosage (c.-à-d. dosage immunologique compétitif ou non compétitif) aussi bien que du système de détection utilisé.
- Les différences dans les dosages peuvent provenir de l'utilisation de standards secondaires différents.

Il est connu depuis des années que les auto-anticorps sont dirigés contre quelques épitopes contrairement aux anticorps hétérologues. Les dosages actuels diffèrent beaucoup dans la reconnaissance des épitopes. Les différences de spécificité peuvent provenir d'une mauvaise reconnaissance d'un épitope qui introduit un biais concernant la population d'auto-anticorps testée. Cela entraîne des différences très importantes de résultats, même lorsque les dosages sont standardisés selon la même préparation de référence internationale. Quel que soit l'auto-antigène visé, il est avéré que les auto-anticorps anti-thyroïdiens ne sont pas des entités moléculaires uniques mais, plutôt, des mélanges d'immunoglobulines qui ont seulement en commun leur capacité d'interagir avec la Tg, la TPO ou le récepteur de la TSH.

Les différences dans la sensibilité des dosages d'auto-anticorps peuvent venir du principe du dosage (par exemple la RIA compétitive par rapport à l'IMA à deux sites) aussi bien que la méthode physique utilisée pour la détection (par exemple un radio-isotope par rapport à la chimiluminescence). Des différences dans la spécificité peuvent se produire à la suite d'une contamination de la préparation de l'auto-antigène par d'autres auto-antigènes (par exemple des microsomes thyroïdiens par rapport à la TPO purifiée). De plus, la mauvaise reconnaissance d'un épitope peut entraîner une sous-estimation de la quantité totale d'auto-anticorps circulants présents, diminuant ainsi la sensibilité du test.

La sensibilité fonctionnelle devrait être déterminée avec des mélanges de sérums humains qui contiennent une faible concentration d'auto-anticorps. Le protocole de sensibilité fonctionnelle devrait être le même que celui décrit pour la TSH (Recommandation 20). La précision inter-essais pour les dosages de TgAb utilisés pour surveiller les patients ayant un cancer de la thyroïde avec des TgAb positifs devrait être déterminée durant une plus longue période (6 à 12 mois), selon la fréquence utilisée pour les dosages de routine clinique.

### **Recommandation 30. Sensibilité fonctionnelle des dosages d'anticorps anti-thyroïdiens**

*La sensibilité fonctionnelle des dosages d'auto-anticorps anti-thyroïdiens doit :*

- être déterminée avec des mélanges sériques humains qui contiennent une faible concentration d'auto-anticorps.
- être déterminée en utilisant le protocole décrit pour la TSH (Recommandation 20) mais avec l'estimation de la précision inter-essais faite sur une période de 6 à 12 mois pour être compatible avec la fréquence des dosages cliniques.

#### **4. Standardisation des dosages d'anticorps anti-thyroïdiens**

La standardisation des dosages d'auto-anticorps anti-thyroïdiens est encore perfectible. Les préparations de référence internationales, MRC 65/93 pour les TgAb, MRC 66/387 pour les TPOAb sont disponibles auprès du *National Council for Biological Standards and Control* à Londres, Royaume-Uni ([www.mrc.ac.uk](http://www.mrc.ac.uk)). Ces préparations ont été réalisées à partir d'un mélange sérique de patients ayant une AITD et ont été préparées et lyophilisées il y a 35 ans !

### **Recommandation 31. Pour la standardisation des dosages d'anticorps anti-thyroïdiens par les fabricants**

- Les essais devraient être standardisés avec les préparations de référence internationale MRC : MRC 65/93 pour les TgAb, MRC 66/387 pour les TPOAb et MRC 90/672 pour les TRAb.
- De nouvelles préparations de référence internationale devraient être préparées pour les TgAb et les TPOAb.
- Les standards secondaires devraient être totalement caractérisés pour éviter les biais entre dosages différents.
- Les préparations de référence ou les préparations d'antigènes recombinants devraient être utilisées lorsqu'elles sont disponibles.

Il est bien connu que les anticorps lyophilisés se dégradent avec le temps. La dégradation des anticorps a pu introduire un biais dans l'activité de liaison de ces préparations de référence par rapport à des anticorps plus stables mais d'intérêt clinique inconnu. A cause de leur quantité limitée, ces préparations ne sont utilisées que comme standards primaires pour étalonner les dosages. Les trousse de dosage commerciales contiennent des standards secondaires qui sont différents pour chaque trousse. Actuellement, l'étalonnage des dosages varie avec les conditions expérimentales et avec la préparation de l'antigène utilisé par le fabricant. Cela peut introduire un autre biais pour la détection des anticorps hétérogènes présents dans les prélèvements de patients. Dans le cas des TRAb, la préparation de référence MRC 90/672 est plus récente (1990) mais elle est utilisée actuellement par un petit nombre de fabricants.

## 5. Les dosages des TPOAb

La thyroperoxydase (TPO) est une hémoglycoprotéine membranaire de 110 kDa comportant un grand domaine extra-cellulaire, un domaine trans-membranaire et un domaine intracellulaire court. La TPO est impliquée dans la synthèse des hormones thyroïdiennes et elle se situe au pôle apical de la cellule folliculaire. Plusieurs isoformes correspondant à des épissages différentiels de l'ARN de la TPO ont été décrits. Les molécules de TPO peuvent aussi différer au niveau de leur structure tri-dimensionnelle, de leur glycosylation et de leur liaison à l'hème. La plupart des molécules de TPO n'arrivent pas à la membrane apicale et sont dégradées dans la cellule.

Les auto-anticorps anti-TPO ont été décrits initialement comme les auto-anticorps anti-microsomaux (AMA) puisqu'ils réagissaient avec des préparations brutes de membranes de cellules thyroïdiennes. L'antigène microsomal été ultérieurement identifié comme étant la TPO (265). Des dosages plus anciens d'AMA, par immunofluorescence ainsi que par agglutination passive de globules rouges tannés, sont encore utilisés en plus des nouveaux dosages immunologiques, compétitifs et non compétitifs, des TPOAb qui sont plus sensibles. Ces nouveaux dosages immunologiques remplacent actuellement l'ancien dosage par agglutination des AMA parce qu'ils sont quantitatifs, plus sensibles et peuvent être automatisés facilement. Cependant, il y a de grandes variations dans la sensibilité et la spécificité des nouveaux dosages de TPOAb. Pour partie, ces variations proviennent de différences dans les préparations de TPO utilisées dans les différentes trousse de dosage. Lorsqu'elle est extraite du tissu thyroïdien humain, la TPO peut être utilisée comme une préparation brute de membrane ou bien être purifiée par différentes méthodes. La spécificité du dosage peut également différer à cause de la contamination par d'autres antigènes thyroïdiens, particulièrement la Tg, et/ou à cause des variations dans la structure tri-dimensionnelle de la TPO. L'utilisation de TPO humaine recombinante (rhTPO) élimine le risque de contamination mais ne résout pas le problème des différences dans la structure de la TPO qui dépend de la technique utilisée pour la purifier. La plupart des dosages de TPOAb actuels sont quantifiés en unités internationales qui utilisent la préparation de référence MRC 66/387. Malheureusement, l'utilisation de ce standard primaire ne réduit pas les variations constatées entre les diverses méthodes comme le montre la grande variabilité dans les limites de sensibilité affirmées par les fabricants des différentes trousse de dosage (zone de 0.3 à 20 kUI/L) ainsi que les différences dans les limites normales de référence.

### Recommandation 32. Dosages conseillés pour les TPOAb

- Des dosages immunologiques de TPOAb sensibles, spécifiques, utilisant des préparations appropriées de TPO humaine native ou recombinante très pures comme antigène, devraient remplacer les anciens tests d'agglutination peu sensibles et semi-quantitatifs des anticorps anti-microsomaux (AMA). (*Niveau du consensus 90 %*)
- La signification clinique d'une faible concentration de TPOAb exige plus d'étude.

**(a) Prédominance des TPOAb & limites de référence.** L'évaluation de la prédominance des TPOAb dépend de la sensibilité et de la spécificité du dosage employé. La récente étude américaine NHANES III portant sur ~17000 sujets sans maladie thyroïdienne apparente, a rapporté des taux de TPOAb détectables chez 12 % des sujets en utilisant un dosage immunologique par compétition (18). Il n'est pas établi si les taux faibles de TPOAb détectés chez des individus sains et/ou des patients avec des maladies auto-immunes non-thyroïdiennes reflètent une physiologie normale, le stade pré-clinique de AITD, ou un problème dans la spécificité du dosage.

Les valeurs normales de référence pour les dosages des TPOAb sont très variables et souvent établies arbitrairement, afin qu'une grande majorité de patients ayant une AITD soit testée positive, et la plupart des sujets sans évidences cliniques de AITD, négatifs. La limite normale inférieure paraît être en rapport avec des facteurs techniques. Plus précisément, des dosages mentionnant une limite de détection basse (< 10 kUI/L) rapportent en général des taux de TPOAb indétectables chez des sujets normaux méticuleusement sélectionnés. De telles méthodes suggèrent que la présence de TPOAb est un signe pathologique. Par contre, les dosages de TPOAb rapportant une limite de détection plus élevée (> 10kUI/L) indiquent en général une « zone normale de référence » pour les TPOAb. Comme de tels dosages paraissent n'avoir aucune amélioration de leur sensibilité de détection des AITD, ces valeurs comprises dans la « zone normale » peuvent représenter un « bruit de fond » non spécifique du dosage et être sans signification pathologique.

L'étude récente des 20 années de suivi de la cohorte Whickham a rapporté que des titres en TPOAb détectables (dosage des AMA) étaient non seulement un facteur de risque pour l'hypothyroïdie mais que des AMA détectables précédaient l'apparition d'une TSH élevée (Fig. 5) (35). Cela suggère que des TPOAb détectables sont un facteur de risque pour les AITD (Recommandation 34). Cependant, des individus avec des taux faibles en TPOAb auraient eu des AMA indétectables par les méthodes anciennes utilisées dans cette étude (35). La signification clinique des taux faibles en TPOAb qui ne sont pas détectables par les dosages par agglutination des AMA reste à établir par des études longitudinales. Donc, des individus avec des taux faibles en TPOAb et/ou en TgAb ne devraient pas être considérés comme des sujets sains jusqu'à ce que des études de suivi à long terme montrent qu'ils n'ont pas de risque accru de développer un dysfonctionnement thyroïdien.

### **Recommandation 33. Limites de référence pour les dosages d'anticorps anti-thyroïdiens**

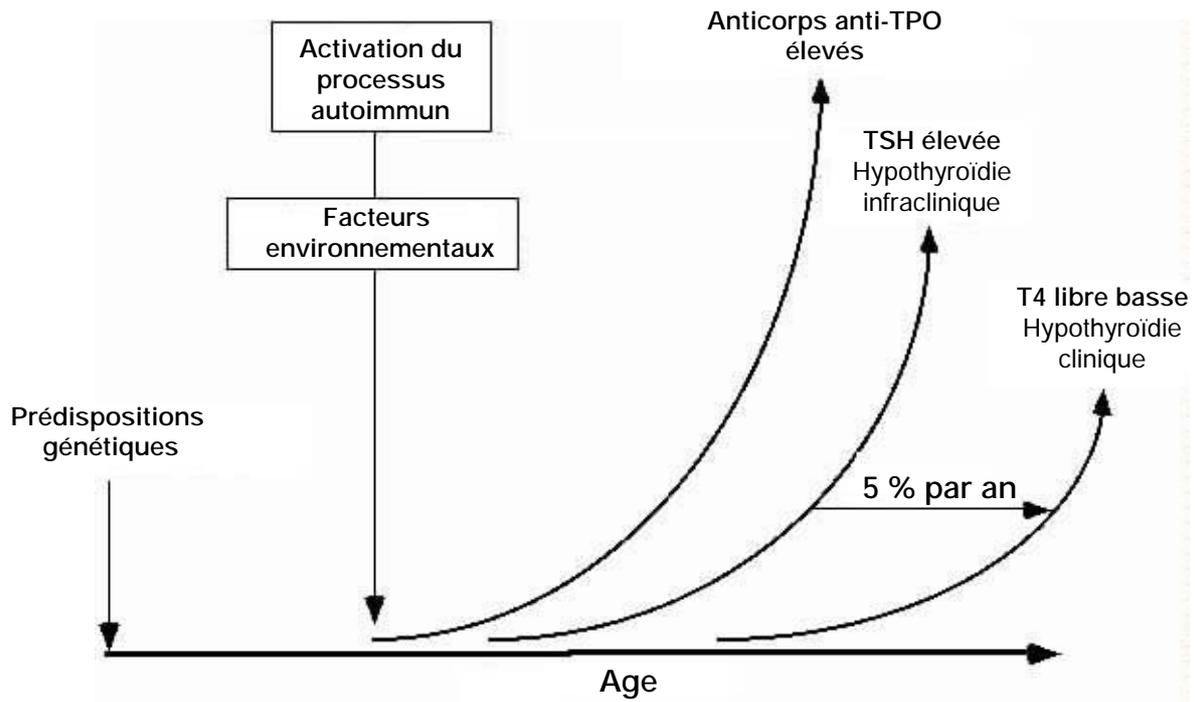
Les limites de référence pour les dosages d'anticorps anti-thyroïdiens devraient être établies à partir de 120 sujets « normaux », n'ayant jamais eu de maladies thyroïdiennes : la sélection des sujets devrait minimiser l'inclusion de personnes avec une prédisposition pour une maladie thyroïdienne auto-immune. Les sujets normaux devraient être :

- De sexe masculin
- Jeunes (< 30 ans)
- Avec des taux de TSH sérique entre 0,5 et 2,0 mUI/L
- Sans goitre
- Sans passé personnel ou familial de maladie thyroïdienne
- Sans maladie auto-immune non thyroïdienne (par exemple lupus ou diabète)

Les critères employés pour sélectionner des sujets pour la cohorte normale en vue d'établir une zone normale de référence pour auto-anticorps, sont essentiels. Une telle cohorte devrait être constituée de sujets de sexe masculin, jeunes et biologiquement euthyroïdiens (TSH 0,5 à 2,0 mUI/L), sans goitre et sans passé familial de AITD. Ce processus de sélection rigoureux devrait éviter d'inclure des sujets ayant une prédisposition aux AITD.

**(b) Utilisations cliniques des dosages de TPOAb.** Les dosages de TPOAb sont les plus sensibles pour détecter une maladie thyroïdienne auto-immune (266). Comme le montre schématiquement la Fig. 5, la présence de TPOAb est typiquement le premier caractère anormal qui survient au cours du développement d'une hypothyroïdie faisant suite à une thyroïdite auto-immune. En fait, quand les TPOAb sont mesurés par un dosage immunologique sensible, plus de 95 % des sujets ayant une thyroïdite auto-immune ont des taux de TPOAb détectables. De telles méthodes détectent également les TPOAb chez la plupart (~ 85 %) des patients ayant une maladie de Basedow (254). Les patients ayant des TPOAb détectés pendant les premiers stades de la grossesse risquent de développer une thyroïdite du post-partum (50). Les patients atteints de trisomie 21 ont un risque accru de dysfonctionnement thyroïdien dû à une AITD et le dosage annuel de la TSH et des TPOAb est important pour eux (267,268).

Des rapports récents ont suggéré que le QI d'enfants nés de mères avec une TSH augmentée et/ou des TPOAb détectables pendant la grossesse peut être affecté (63-65). Cela incite à recommander, pour toutes les femmes enceintes, le dosage de la TSH et des TPOAb dans le premier trimestre de leur grossesse [2.A3] et (Recommandation 4). Ensuite, les dosages de TPOAb peuvent être utiles dans les problèmes de stérilité puisque des taux élevés en TPOAb sont associés à un risque élevé de fausses couches et à des difficultés à concevoir par fécondation *in vitro* (269).



**Fig. 5. Changements dans les taux de TPOAb au cours du développement d'une maladie auto-immune thyroïdienne.**

Il est bien établi que la présence de TPO Ab est un facteur de risque de dysfonctionnement thyroïdien quand les patients sont traités avec le lithium, l'amiodarone, l'interleukine-2 ou l'interféron (75,259,260,261,270). Pendant un traitement à l'interféron, un désordre auto-immun thyroïdien préexistant ou des taux de TPOAb positifs sont des facteurs qui prédisposent au développement d'une maladie thyroïdienne au cours de la thérapie (262). Il apparaît cependant qu'il n'y a aucune augmentation de la fréquence de dysfonctionnements thyroïdiens pendant une thérapie à l'interféron (271). La présence de TPOAb avant la thérapie indique, avec une sensibilité de 20 %, une spécificité de 95 % et une valeur prédictive de 66.6 %, qu'il y aura développement d'un dysfonctionnement thyroïdien (272).

#### **Recommandation 34. Utilisation du dosage des TPOAb**

- Pour le diagnostic de AITD
- Comme facteur de risque pour une AITD
- Comme facteur de risque d'hypothyroïdie pendant une thérapie à base d'Interféron, d'Interleukine-2 ou de Lithium
- Comme facteur de risque pour un dysfonctionnement thyroïdien pendant une thérapie à l'amiodarone (Recommandation 5)
- Comme facteur de risque d'hypothyroïdie chez les patients atteints de trisomie 21

- Comme facteur de risque pour un dysfonctionnement thyroïdien pendant la grossesse et pour la thyroïdite du post-partum
- Comme facteur de risque pour faire une fausse-couche et pour l'échec de la fécondation *in vitro*

## 6. Dosage des auto-anticorps anti-thyroglobuline (TgAb)

La thyroglobuline (Tg), la pro-hormone thyroïdienne, est une glycoprotéine soluble de poids moléculaire élevé (660 kDa), composée de deux sous-unités identiques. La Tg présente un degré d'hétérogénéité élevé dû à des différences apportées par ses modifications post-traductionnelles (glycosylation, iodation, sulfatation). Pendant le processus de synthèse et de libération des hormones thyroïdiennes, la Tg est polymérisée et dégradée. Par conséquent, la structure immunologique de la Tg est extrêmement complexe. Les caractéristiques des préparations de Tg peuvent varier largement selon l'origine du tissu thyroïdien humain et le procédé de purification utilisé. C'est le premier indice expliquant pourquoi les dosages des TgAb et de la Tg [3.E2] sont si difficiles à standardiser.

**(a) Dosage des TgAb.** Comme pour les dosages des TPOAb, les principes de dosage des TgAb ont évolué de l'immunofluorescence sur coupes de tissu thyroïdien à des méthodes par agglutination passive de globules rouges tannés jusqu'aux plus actuels dosages immunologiques compétitifs et non compétitifs. Cette évolution technique a amélioré la sensibilité et la spécificité des dosages des TgAb sériques. Cependant, parce que les dosages plus anciens sont encore utilisés concurremment aux plus récents dans les laboratoires cliniques, la sensibilité et la spécificité des dosages disponibles peuvent varier largement selon le laboratoire. Les dosages sont étalonnés avec des préparations brutes ou purifiées de TgAb en mélangeant les sérums de patients ou des préparations d'immunoglobulines de donneurs. Ces différents standards secondaires sont souvent, mais pas toujours, étalonnés par rapport au standard primaire (MRC 65/93). Cependant, la standardisation avec le MRC 65/93 n'assure pas que des méthodes différentes soient quantitativement ou qualitativement semblables. D'autres raisons entraînant des différences entre méthodes sont en rapport avec l'hétérogénéité des TgAb eux-même. L'hétérogénéité des TgAb est restreinte chez les patients ayant une AITD en comparaison à d'autres désordres thyroïdiens comme les carcinomes thyroïdiens différenciés (DTC) dans lesquels l'hétérogénéité des TgAb apparaît plus large (273). Cela reflète des différences dans l'expression des différents auto-anticorps qui, normalement, peuvent être présents à de très faibles taux chez les individus sains (274). La variabilité inter-essais des taux sériques de TgAb peut également refléter des différences qualitatives dans l'affinité et la spécificité épitopique des TgAb présents dans différents échantillons sériques de patients présentant diverses conditions thyroïdiennes et immunologiques. Une autre raison pour expliquer les différences inter-essais est l'interférence de taux élevés d'antigène circulant (Tg) dans le principe même du dosage, comme on l'observe souvent dans les cas de maladie de Basedow avec métastases de DTC (275).

### **Recommandation 35. Mise au point des dosages de TgAb par les fabricants**

La spécificité épitopique des dosages de TgAb devrait être large et non restreinte, puisque la spécificité épitopique des TgAb de patients positifs en TgAb ayant un DTC peut être plus étendue que celle de patients ayant une AITD.

**(b) Prédominance & limites de référence pour les TgAb.** Comme pour les anticorps anti-TPO, la prédominance et les valeurs limites normales pour les TgAb dépendent de la sensibilité et la spécificité des dosages (276). L'étude NHANES III a rapporté une prévalence des TgAb, mesurés par un dosage immunologique par compétition, de ~ 10 % dans la population générale, (18). La prédominance des TgAb apparaît deux fois plus élevée que la normale pour les patients ayant un DTC (~ 20 %) (276). Comme pour les TPOAb, la signification clinique de taux faibles en TgAb qui seraient indétectables par les anciennes méthodes par agglutination reste à préciser. Il a été suggéré que des taux faibles puissent représenter des anticorps « naturels » chez les individus normaux ou une réponse anticorps « nettoyante » faisant suite à la libération d'antigène lors d'une chirurgie thyroïdienne ou d'une thérapie à l'iode radioactif. Par ailleurs, des taux faibles peuvent indiquer une AITD silencieuse sous-jacente (256). Divers dosages de TgAb rapportent des valeurs limites normales différentes, comme on l'a vu pour les TPOAb [3.D5 (a)]. En particulier, quelques dosages de TgAb rapportent que les sujets normaux devraient avoir des valeurs en dessous de la limite de détection du dosage, d'autres dosages mentionnent une « zone normale ». Quand le dosage des TgAb est utilisé en complément du dosage de la Tg sérique, la signification des taux faibles de TgAb se rapporte moins à leur valeur physiopathologique qu'à leur capacité d'interférer dans le dosage de la Tg sérique.

### **Recommandation 36. Dosage des TgAb dans les conditions non néoplasiques**

- Dans les régions avec un apport suffisant en iode, il n'est pas toujours nécessaire ou rentable de prescrire à la fois le dosage des TPOAb et des TgAb, parce que les patients négatifs en TPOAb avec des TgAb détectables présentent rarement un dysfonctionnement thyroïdien.
- Dans les régions pauvres en iode, le dosage des TgAb sériques peut être utile pour détecter une AITD quand les patients ont un goitre nodulaire.
- Pour suivre une thérapie à base d'iode dans les cas de goitres endémiques.

**(c) Sensibilité et précision des dosages de TgAb.** Les dosages quantitatifs sensibles de TgAb constituent un test complémentaire essentiel au dosage de la Tg sérique. Les dosages qualitatifs par agglutination ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter les

concentrations basses de TgAb qui peuvent interférer avec le dosage de la Tg sérique (276). Comme pour les dosages des TPOAb [3.D5 (a)], les valeurs absolues rapportées par différents dosages immunologiques des TgAb sont très variables, ce qui empêche d'utiliser des dosages de fabricants différents pour l'étude en série de patients ayant un DTC. Il y a deux types de dosage immunologiques pour les TgAb. Le premier est caractérisé par des limites de détection basses (< 10 kUI/L) et une limite normale de référence indétectable. De tels dosages suggèrent que la présence de TgAb est un signe pathologique. L'autre type de dosage rapporte des limites de détection plus élevées (> 10kUI/L) et mentionne une « zone normale de référence » pour les TgAb. Il est probable que les valeurs de cette « zone normale » détectable représentent simplement un « bruit de fond » non spécifique du dosage dû à la faible sensibilité du test ou à des problèmes de spécificité puisque ces valeurs faibles de « zone normale » n'interfèrent pas avec les mesures de la Tg sérique [3.E6].

**(d) Utilisations cliniques du dosage des TgAb.** L'utilité clinique du dosage des TgAb pour attester de la présence d'une auto-immunité thyroïdienne est débattue. L'étude américaine NHANES III a rapporté que 3 % des sujets sans facteurs de risque pour maladies thyroïdiennes avaient des TgAb détectables sans la présence associée de TPOAb (18). Comme cette cohorte n'avait aucune augmentation de TSH associée, les dosages des TgAb ne paraissent pas être un test diagnostique utile pour les AITD dans les régions riches en iode (256,279). Cependant, dans les régions pauvres en iode, les TgAb sont utiles pour détecter une AITD, surtout dans les cas de patients ayant un goitre nodulaire. Les dosages des TgAb sont aussi utiles pour suivre la thérapie à base d'iode pour goitre endémique, puisque les molécules de Tg iodées sont plus immunogéniques.

#### **Recommandation 37. Dosage des TgAb dans les cancers thyroïdiens différenciés (DTC)**

*La concentration en TgAb devrait être mesurée POUR CHAQUE SERUM DE PATIENT avant le dosage de la Tg parce que des taux faibles en TgAb peuvent interférer dans les dosages de la Tg sérique provoquant soit des valeurs faussement basses ou indétectables, soit des valeurs élevées selon le type de dosage de la Tg utilisé.*

- Les TgAb devraient être mesurés dans chaque échantillon sérique envoyé au laboratoire pour le dosage de la Tg.
- Des mesures en série de TgAb devraient être faites sur tous les patients positifs en TgAb ayant un DTC en utilisant la même trousse de dosage parce que l'évolution du taux de TgAb a une signification pronostique pour le suivi d'une réponse à un traitement pour DTC.
- Les dosages pour TgAb devraient être immuno-métriques et non par agglutination, parce que des taux faibles en TgAb peuvent interférer avec les mesures de Tg sériques dans la plupart des dosages, et les dosages en série doivent être quantitatifs et non qualitatifs.

- Le test de récupération de la Tg sérique ne détecte pas de manière fiable la présence de TgAb et devrait être déconseillé comme méthode pour détecter les TgAb (Recommandation 46).
- Avant de changer le dosage des TgAb, le laboratoire devrait en informer les cliniciens demandeurs et évaluer le rapport entre les valeurs obtenues par l'ancien et le nouveau dosage. Le taux de la Tg sérique des patients devraient être re-évalué si la différence entre les deux méthodes a un CV > 10% .

Le dosage des TgAb sériques est utilisé, au départ, comme un test complémentaire quand le dosage de la Tg sérique est demandé. L'utilité clinique du dosage des TgAb sériques chez des patients ayant un DTC est double. En premier, un dépistage sensible et spécifique des TgAb sériques chez ces patients cancéreux est nécessaire, parce que même de faibles concentrations d'anticorps peuvent interférer avec les mesures de la Tg dans la plupart des dosages [3.E6] (275,276). En second, les dosages en série de TgAb peuvent servir comme test de substitution pour la détection de tumeurs chez les patients positifs en TgAb dont la mesure de la Tg peut être peu fiable (276). Plus précisément, les patients positifs en TgAb qui sont guéris deviennent, la plupart du temps, négatifs en TgAb dans l'espace de 1 à 4 ans (276,277,278). Par contre, les patients qui ont une affection persistante après traitement gardent des concentrations de TgAb détectables. En fait, une augmentation du taux de TgAb est souvent la première indication de récurrence chez de tels patients (276).

## 7. Auto-anticorps anti-récepteur de la TSH (TRAb)

Le récepteur de la TSH est un membre de la « superfamille » des récepteurs à sept domaines trans-membranaires liés aux protéines G. Le gène de 60kb du récepteur de la TSH, localisé sur le bras long du chromosome 14q31, a été cloné et séquencé (272). Les exons 1 à 9 codent pour le domaine extra-cellulaire du récepteur (397 acides aminés) et l'exon 10 code pour la région trans-membranaire (206 acides aminés). L'activation des protéines G par le complexe hormone-récepteur entraîne la stimulation de la production de cAMP par l'adénylate-cyclase et le renouvellement de l'inositol phosphate par les phospholipases (280). La mutagenèse dirigée a montré que la structure tridimensionnelle du récepteur est importante pour l'interaction avec la TSH et/ou les TRAb. Il y a trois grands types de TRAb qui sont dosés soit par dosage biologique, soit par dosage des récepteurs (Tableau 6). Les dosages d'immunoglobulines anti-récepteur ou inhibitrices de la fixation de la TSH (TBII) ne mesurent pas directement l'activité biologique, mais évaluent si l'échantillon contient des immunoglobulines qui peuvent bloquer in vitro la liaison de la TSH à une préparation de récepteurs. Les anticorps stimulant le récepteur de la TSH (TSAb) paraissent lier la portion N-terminale du domaine extra-cellulaire du récepteur et imitent les actions de la TSH en induisant la transduction du signal post-récepteur et la stimulation de la cellule. Par contre, la région C-terminale du récepteur de la TSH est plus importante pour les anticorps qui bloquent le récepteur (TBAb ou TSBAb) ce qui empêche la stimulation par les TSAb ou la TSH et provoque l'hypothyroïdie (281). Les immunoglobulines stimulant la croissance de la thyroïde (TGI) sont moins bien caractérisées.

Aujourd'hui, nous savons que le manque de corrélation entre les taux de TRAb et le statut clinique des patients est, pour une grande part, dû à l'hétérogénéité des TRAb circulants. Le fait que des TRAb différents peuvent coexister chez un patient donné et changer avec le temps explique pourquoi il a été difficile de développer des dosages de TRAb d'une grande fiabilité diagnostique (282,283). En effet, le diagnostic clinique des patients atteints de la maladie de Basedow ayant des TSAb et des TBAb/TSBAb dépendra vraisemblablement de la concentration relative et de l'affinité des anticorps prédominants. Le passage des TRAb stimulants aux TRAb bloquants peut expliquer la rémission spontanée de la maladie de Basedow pendant la grossesse aussi bien que l'induction d'une hypothyroïdie transitoire par l'iode radioactif (281,284). Il est important de noter que les dosages biologiques qui utilisent des préparations cellulaires pour mesurer les effets biologiques des TRAb (stimulation, inhibition de l'activité de la TSH ou de la croissance cellulaire) peuvent détecter des changements fonctionnels dans l'hétérogénéité des TRAb. Par contre, les dosages des anticorps anti-récepteurs, ou des immunoglobulines inhibitrices de la fixation de la TSH (TBII) qui sont utilisés par beaucoup de laboratoires cliniques mesurent simplement la capacité d'un sérum ou d'une préparation d'IgG à bloquer la liaison d'une préparation de TSH à son récepteur et ne mesure pas la réponse biologique (Tableau 6). Cette différence fondamentale dans le principe du dosage explique pourquoi les dosages biologiques et ceux du récepteur affichent habituellement une corrélation faible ( $r = 0,31 - 0,65$ ) (283,285).

**(a) Dosage des TRAb.** Le premier article sur la présence d'un stimulateur thyroïdien qui différait de la TSH par sa demi-vie plus longue (LATS) a été publié en 1956, utilisant un dosage biologique *in vivo* (286). Le LATS a été identifié ultérieurement comme étant une immunoglobuline. Comme la TSH, les TRAb stimulent à la fois les voies du cAMP et de l'inositol phosphate de la cellule folliculaire thyroïdienne, et donc stimulent et bloquent à la fois la synthèse des hormones thyroïdiennes et la croissance de la glande (283).

Les types de dosages développés pour tester les TRAb sont classés en fonction de leur activité fonctionnelle, comme cela est indiqué dans le Tableau 6. Des études sur des souris et sur des lignées cellulaires FRTL-5, de même que sur des êtres humains, montrent qu'une forte concentration de gonadotrophine chorionique humaine (hCG) est aussi un agoniste faible des TRAb et peut stimuler le AMPc, le transport de l'iodure, et la croissance cellulaire (56). Les fortes augmentations de l'hCG suite à un choriocarcinome peuvent, dans des cas rares, induire un résultat positif en TRAb erroné. Cependant, l'augmentation de l'hCG, courante lors d'une grossesse normale ou chez des patients traités pour une môle hydatiforme, n'est généralement pas suffisamment élevée pour provoquer un faux résultat positif.

**(b) Dosages biologiques (TSAb, TBAb/TSBAb et TGI).** La plupart des dosages biologiques actuels sont basés sur l'activation par le récepteur de la TSH de la production du deuxième messenger (AMPc) à partir d'une préparation cellulaire (FRTL-5/CHO TSH-R) exposée à un échantillon sérique ou une préparation d'IgG (287-289). Le clonage récent du récepteur de la TSH a été bénéfique aux dosages biologiques en facilitant le développement de lignées cellulaires transfectées par le récepteur de la TSH (290,291). Bien que ces dosages biologiques soient disponibles dans plusieurs laboratoires commerciaux aux États-Unis et en Asie, ils le sont moins en Europe à cause des règlements qui interdisent l'usage d'organismes génétiquement modifiés. Malheureusement, la corrélation entre les résultats des dosages de TRAb et le diagnostic clinique est encore faible. Par exemple, la sensibilité diagnostique pour la maladie de Basedow qui utilise le dosage biologique des TRAb s'étend de 62,5 à 81 % (283). Les nouvelles approches qui emploient des dosages utilisant des molécules chimériques peuvent être capables de cibler les emplacements d'épitopes de TRAb et les sites de liaison de

la TSH et donc fournir une meilleure corrélation entre réponse du dosage et diagnostic clinique (281,284,292-294).

**Tableau 6. Dosages des anticorps anti-récepteur de la TSH (TRAb).**

<b>Anticorps</b>	<b>Fonction</b>	<b>Méthode de détection</b>
<b>TSAb</b> anticorps stimulant la thyroïde	Stimulent la production de AMPc, la capture de l'iodure, la synthèse de la thyroglobuline	dosage biologique cellulaire (FRTL-5/CHO TSH-R) % de la stimulation de la synthèse de AMPc par la TSH comparée à des mélanges de sérums normaux.
<b>TBAb/ TSBAb</b> anticorps bloquant le récepteur de la TSH	Inhibent la production de AMPc induit par la TSH, la capture de l'iodure, la synthèse de la thyroglobuline	dosage biologique cellulaire (le même que précédemment) % d'inhibition de la synthèse de AMPc par la TSH comparée à des mélanges de sérums normaux.
<b>TGI</b> anticorps stimulant la croissance de la thyroïde	Stimulent la croissance cellulaire thyroïdienne	Cellules FRTL-5 incorporation de thymidine tritiée- dosage d'arrêt mitotique
<b>TBII</b> Immunoglobulines qui inhibent la fixation de la TSH à la thyroïde	Inhibent la fixation de la <sup>125</sup> I-TSH à son récepteur	dosage des anticorps anti-TSH-R porcin, soluble ou anti-TSH-R humain, recombinant

(c) **Dosage des anticorps anti-récepteur de la TSH (TBII).** Les dosages des immunoglobulines qui inhibent la liaison de la TSH à la thyroïde (TBII) sont commercialement disponibles et sont utilisés par beaucoup de laboratoires cliniques. Ces dosages mesurent l'inhibition de la fixation de la TSH marquée à l'iode 125 soit aux récepteurs porcins solubilisés ou, plus récemment, aux récepteurs de la TSH humaine recombinante (295-297). Ce type de dosage ne fait pas la distinction entre stimulation et blocage par les TRAb. L'activité TBII est mesurée, en général, à partir d'un sérum positif en TRAb étalonné lui-même à partir d'un sérum standard de référence. Le sérum standard le plus fréquemment utilisé a été le sérum de référence MRC, LATS-B. Un standard OMS (MRC 90/672) est devenu disponible récemment. L'hétérogénéité inhérente des TRAb dans le sérum de patients et la source de récepteurs utilisés (porcin ou humain recombinant) sont des causes possibles de la grande variabilité observée entre les dosages de TBII, en dépit de l'utilisation du même standard (283,298). Bien que les dosages de TBII utilisant le récepteur de la TSH humaine recombinante sont maintenant disponibles et peuvent avoir une plus grande sensibilité diagnostique pour la maladie de Basedow, ils ne paraissent pas offrir une spécificité ou une sensibilité améliorée pour pronostiquer une réponse à une thérapie médicamenteuse anti-thyroïdienne (ATD) (297,299).

### Recommandation 38. Dosage des anticorps anti-récepteur de la TSH (TRAb)

*Les dosages des TRAb en laboratoire clinique sont soit :*

- Des dosages de l'inhibition de la fixation de la TSH à son récepteur (TBII) qui ne mesurent pas directement une activité de stimulation mais détectent des immunoglobulines dans l'échantillon sérique qui bloquent *in vitro* la fixation d'une préparation de TSH marquée à une préparation de récepteur de la TSH. Ces dosages de TRAb sont les plus communément utilisés dans les laboratoires cliniques.
- Des dosages biologiques d'anticorps anti-récepteur de la TSH (TSAb) utilisant des cellules (cellules FRTL-5 ou, plus récemment, cellules CHO transfectées avec le récepteur de la TSH humaine) pour détecter les immunoglobulines qui stimulent la thyroïde (TSAb) en augmentant soit le AMPc, soit la capture de l'iode. Ces épreuves ne sont pas disponibles de manière courante dans tous les pays.
- En général, il y a une faible corrélation entre les résultats de TSAb et de TBII (60-75 %). Les dosages de TSAb affichent une positivité de 80 à 100 % et ceux de TBII une positivité de 70 à 90 % pour les patients ayant une hyperthyroïdie de Basedow non traitée. Aucun des tests n'a une grande spécificité ou sensibilité pour pronostiquer la rémission de l'hyperthyroïdie de Basedow.
- La production normale ou anormale de hCG par un choriocarcinome est connue pour interagir avec le dosage des anticorps anti-récepteur de la TSH ce qui pourrait entraîner de faux résultats positifs. Cela peut être observé dans de rares cas de choriocarcinomes mais pas pendant une grossesse normale ou une môle hydatiforme traitée dans lesquelles le niveau d'hCG n'est pas assez élevé pour provoquer un faux résultat positif.

**(d) Limites de référence pour les TRAb.** En dépit de l'adoption d'une nouvelle préparation de référence internationale MRC 90/672, les valeurs de TRAb sont encore dépendantes du dosage employé et les limites de référence varient selon la sélection de la population « normale » utilisée pour déterminer le niveau seuil pour un résultat positif. Ce seuil est généralement défini comme valant deux déviations standard de la valeur moyenne des sujets normaux.

## 8. Utilisations cliniques des dosages des TRAb

L'utilisation clinique des dosages des TRAb pour le diagnostic et le suivi des AITD reste matière à controverse et diffère fortement d'un pays à l'autre.

**(a) Hyperthyroïdie.** Le diagnostic différentiel de l'hyperthyroïdie peut être établi chez la plupart des patients sans avoir recours au dosage des TRAb. Néanmoins, la présence de TRAb peut distinguer la maladie de Basedow des thyrotoxicoses factices et autres manifestations d'hyperthyroïdie comme la thyroïdite subaiguë ou celle du post-partum et le goitre nodulaire toxique.

### Recommandation 39. Utilisations cliniques des dosages des TRAb

- Explorer l'étiologie de l'hyperthyroïdie quand le diagnostic clinique n'est pas évident.
- Une concentration en TRAb déclinante pendant une thérapie médicamenteuse anti-thyroïdienne au long cours suggère une rémission. Cependant les mesures de TRAb peuvent être erronées chez 25 % de ces patients.
- Les dosages de TRAb sont utiles pour diagnostiquer des patients atteints de la maladie de Basedow et pour mettre en relation les taux de TRAb avec un algorithme de traitement.
- Évaluer des patients suspectés « d'ophtalmopathie par euthyroïdie basedowienne ». Cependant, des TRAb indétectables n'excluent pas cette pathologie.
- Bien que les dosages des TSA b présentent des avantages théoriques, quelques-uns croient que les dosages des TBII qui détectent les anticorps stimulants (TSA b) et les rares cas d'anticorps bloquants (TBA b/TSA b) sont d'une utilité égale.
- Pour les femmes enceintes ayant ou ayant eu une maladie de Basedow. Il est à noter que les femmes enceintes euthyroïdiennes, après avoir reçu un traitement médicamenteux anti-thyroïdien pour la maladie de Basedow antérieurement à leur grossesse, présentent un risque négligeable pour développer une hyperthyroïdie du fœtus ou du nouveau-né.
- Les femmes enceintes euthyroïdiennes (avec ou sans traitement par la L-T4) qui ont eu un traitement à l'iode radioactif pour la maladie de Basedow antérieurement à leur grossesse devraient avoir un dosage des TRAb aussi bien au début de leur grossesse où une valeur élevée est un facteur de risque d'hyperthyroïdie pour le fœtus (2-10%), que pendant le troisième trimestre de leur grossesse afin d'évaluer le risque d'hyperthyroïdie pour le nouveau-né.
- Les femmes enceintes qui prennent des médicaments anti-thyroïdiens (ATD) pour la maladie de Basedow afin de maintenir un état euthyroïdien pendant la grossesse devraient

avoir un dosage de TRAb pendant le troisième trimestre de leur grossesse. Une valeur de TBII élevée devrait inciter à une évaluation clinique et biochimique du nouveau-né pour hyperthyroïdie, aussi bien à la naissance (sang du cordon) que 4 à 7 jours après, lorsque que les effets du passage trans-placentaire d'ATD ont été perdus.

- L'estimation du risque de dysfonctionnement thyroïdien pour le fœtus et le nouveau-né nécessite la détection de TRAb bloquants ou stimulants quand les mères n'ont plus leur thyroïde intacte après une thérapie antérieure pour l'hyperthyroïdie de Basedow.
- Identifier les nouveau-nés avec une hypothyroïdie transitoire due à la présence d'anticorps bloquant le récepteur de la TSH.

**(b) Pronostic de l'évolution de la maladie de Basedow traitée.** Les dosages de TRAb ont aussi été proposés comme un moyen d'anticiper l'évolution de la maladie de Basedow. Un taux de TRAb déclinant est souvent constaté chez des patients hyperthyroïdiens en rémission clinique après un traitement médicamenteux anti-thyroïdien (ATD). Après l'arrêt de l'ATD, des taux de TRAb très élevés correspondent très bien à une rechute rapide, mais cette situation concerne très peu de patients. Par contre, un bon nombre de patients avec des taux de TRAb indétectables ou bas rechuteront. Une méta-analyse du rapport entre le taux de TRAb et le risque de rechute a montré que 25 % des patients sont « classés » de manière erronée par les dosages de TRAb (263). Cela suggère qu'après une thérapie par ATD, un suivi des patients est nécessaire quels que soient les taux de TRAb au moment de l'arrêt de l'ATD et que le dosage des TRAb n'est pas rentable dans ce cas (263).

**(c) Femmes enceintes et nouveaux-nés.** Il existe un consensus général pour que les mesures de TRAb puissent être utilisées pour pronostiquer des dysfonctionnements thyroïdiens du fœtus et/ou du nouveau-né chez les femmes enceintes ayant eu une AITD précédemment à leur grossesse (8,252). Des taux élevés de TRAb chez la mère pendant le troisième trimestre de sa grossesse suggèrent un risque de dysfonctionnement thyroïdien chez sa progéniture (8,282). De 2 à 10% de femmes enceintes avec des taux de TRAb très élevés mettent au monde des nouveau-nés hyperthyroïdiens (8). Le risque d'hyperthyroïdie pour le nouveau-né est négligeable après un traitement efficace de l'hyperthyroïdie par médicaments anti-thyroïdiens (ATD), mais elle peut se développer après un traitement à l'iode radioactif si les taux de TRAb restent élevés (8). Les femmes enceintes euthyroïdiennes (avec ou sans traitement par la L-T4) qui ont subi antérieurement une thérapie à l'iode radioactif pour la maladie de Basedow doivent avoir un dosage de TRAb :

- au début de leur grossesse, où une valeur élevée est un facteur du risque considérable pour une hyperthyroïdie du fœtus.
- pendant le troisième trimestre de leur grossesse afin d'évaluer le risque d'hyperthyroïdie pour le nouveau-né (8).

Les femmes enceintes qui prennent des ATD pour une maladie de Basedow devraient avoir un dosage des TRAb pendant le troisième trimestre de leur grossesse. Des taux de TRAb élevés chez de tels patients devrait inciter à une évaluation clinique et biochimique complète du nouveau-né pour hyperthyroïdie, aussi bien à la naissance (sang du cordon) que 4 à 7 jours après, lorsque les effets du passage transplacentaire des ATD ont disparu (300). Il est à noter que les dosages des TBII sont souvent utilisés dans ce but puisqu'ils détectent les anticorps stimulants (TSAb) et, dans de rares cas, les anticorps bloquants (TBAb/TSBAb) qui

provoquent une hypothyroïdie transitoire chez 1 sur 180000 nouveau-nés (301). Il est aussi recommandé de mesurer les anticorps stimulants et inhibiteurs car l'expression du dysfonctionnement thyroïdien chez la mère peut être différente de celle de l'enfant (253).

**(d) Exophtalmie.** Le rôle des TRAb dans l'association de l'exophtalmopathie (TAO) à la thyroïde est incertain (302). La TAO paraît être exacerbée par une thérapie à l'iode radioactif (303). En outre, les taux de TRAb et d'autres anticorps anti-thyroïdiens augmentent de manière significative après une thérapie à l'iode radioactif (304-306). Cela suggère que les mesures de TRAb avant la thérapie à l'iode radioactif peuvent être utiles pour pronostiquer le risque de TAO mais, à ce jour, il n'y a pas d'études prospectives pour documenter cette observation.

### 9. Directions futures

Il est important qu'une étude comparative bien structurée des dosages d'auto-anticorps anti-thyroïdiens commercialement disponibles soit menée. Cela fournirait des évidences irréfutables que des différences existent dans la performance des dosages actuels (296). Cela aiderait aussi à convaincre les scientifiques des laboratoires cliniques d'éviter d'utiliser des dosages qui ont une faible performance clinique et à encourager les fabricants à améliorer leurs produits ou à les retirer du marché.

#### **Recommandation 40. Les améliorations nécessaires dans les dosages des anticorps anti-thyroïdiens**

- Les dosages des auto-anticorps anti-thyroïdiens actuels devraient être soumis à une étude comparative de leurs performances analytiques et cliniques.
- Une étude comparative des préparations d'antigènes actuellement utilisées faciliterait l'identification du (des) dosage (s) d'auto-anticorps anti-thyroïdiens convenant le mieux pour une utilisation clinique.
- Les caractéristiques des préparations d'antigènes utilisées dans les dosages devraient être précisées pour tous les dosages d'auto-anticorps anti-thyroïdiens.
- Des préparations d'antigènes de référence devraient être rendues disponibles.

#### **Recommandation 41. Pour les fabricants développant des dosages d'anticorps anti-thyroïdiens**

- Des méthodes absolues ou « standards de référence » restent un objectif pour le futur.
- La notice de la trousse de dosage devrait documenter les méthodes utilisées pour produire les réactifs antigéniques, le principe du dosage et toutes les conditions expérimentales qui ont trait aux interactions antigène - anticorps.

- La spécificité des standards secondaires devrait être sélectionnée par rapport aux interactions entre les auto-anticorps dans le sérum des patients et leur antigène spécifique.
- Les dosages immunologiques des TPOAb et des TgAb devraient être testés pour l'effet crochet en utilisant ~20 échantillons avec des concentrations d'anticorps > 1000 kUI/L et ~20 échantillons avec des taux au-dessus de 10000 kUI/L.
- Les dosages des TgAb devraient être testés pour les effets dus à une forte présence d'antigène (Tg) en leur confrontant une gamme de sérums contenant une concentration faible en TgAb avec des taux de Tg compris entre > 10000 et > 100000 µg/L (ng/mL).