

DOSAGE DES ANTICORPS IMPLIQUES DANS L'AUTOIMMUNITE THYROIDIENNE

Catherine MASSART

Unité fonctionnelle d'Hormonologie
Centre d'Investigation Clinique INSERM 1414
CHU RENNES, Université RENNES 1

catherine.massart@chu-rennes.fr

INTRODUCTION

Importance des **marqueurs de l'autoimmunité thyroïdienne**
en Pathologie Endocrinienne

Simplicité des dosages

Difficultés

- Méthodes de dosage utilisées
- Interprétation des résultats

Recommandations

1) Consensus américain:

Guidelines de la NACB (National Academy of Biological Biochemistry)

Baloch et al; Thyroid 2003; 1:45-56

2) *Données récentes de la littérature*

- Indications cliniques
- Conduites préconisées pour les dosages (Biologistes et Fournisseurs)

Maladies thyroïdiennes autoimmunes (MTAI)

1) Définition

Résultent d'une dérégulation du système immunitaire

Possèdent les caractéristiques d'autoimmunité

- **cellulaire**: infiltrats lymphocytaires B et T
- **humorale**: autoanticorps dirigés contre des antigènes thyroïdiens

Sur un terrain génétiquement prédisposé

Prédominance féminine

Problème de santé publique

Fréquence

Retentissement médico-économique

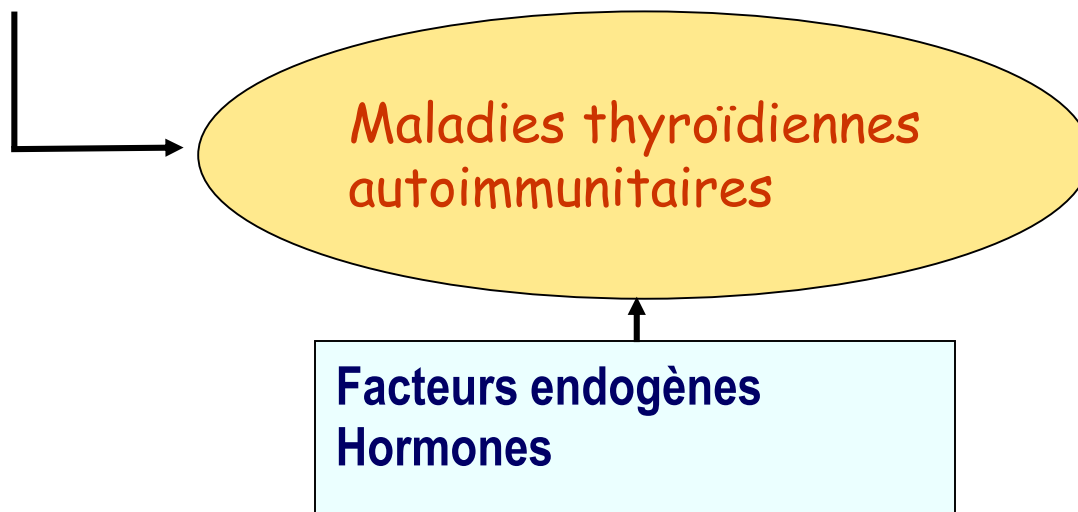
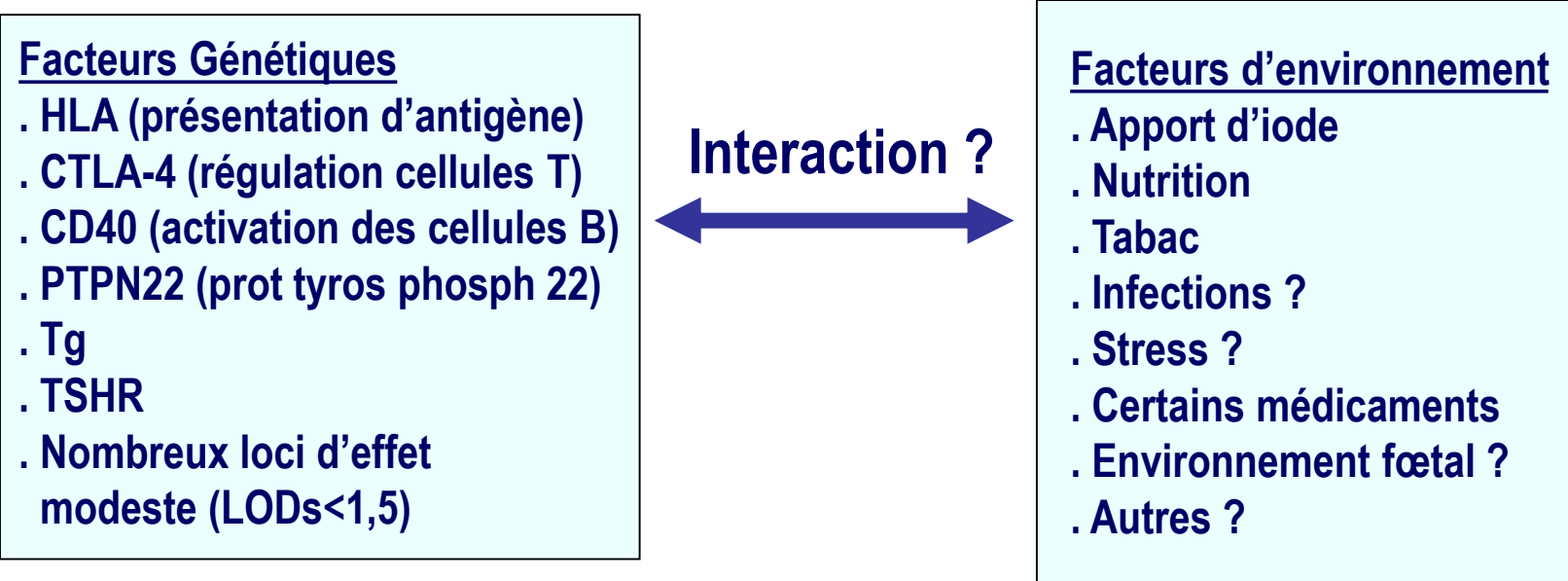
2) Etiologie

Deux entités principales

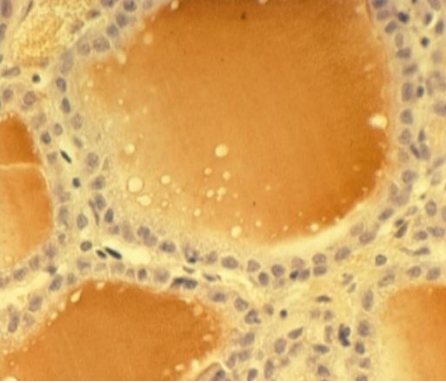
- **Maladie de Basedow** (hyperthyroïdie)
- **Thyroïdites autoimmunes** (hypothyroïdie)

Peuvent être englobées dans des **polyendocrinopathies**

3) Pathogénie

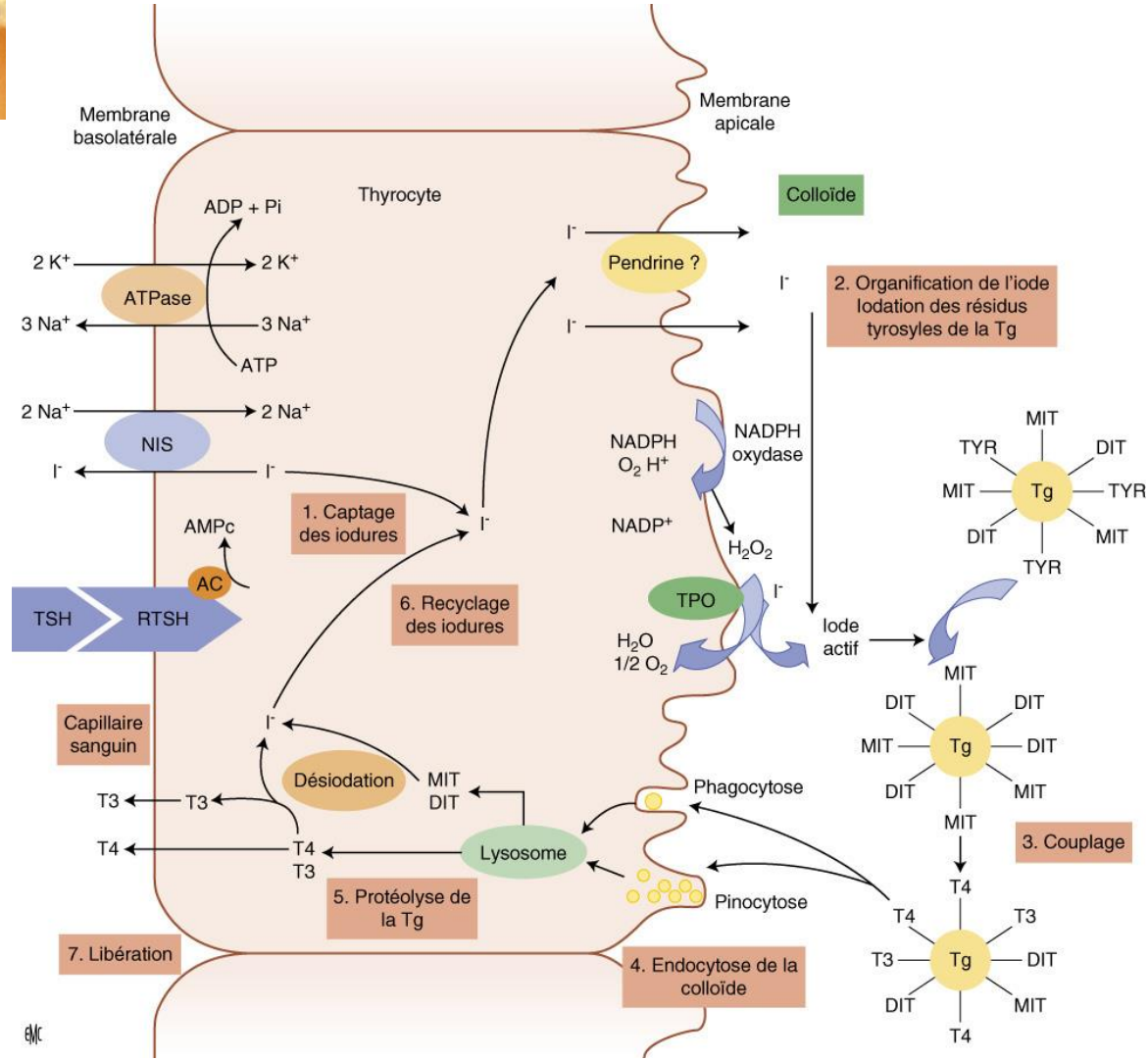


D'après Brix et Hegedus ,1999



Antigènes principaux impliqués dans les MTAI

Thyroperoxydase (TPO)
 Thyroglobuline (Tg)
 Récepteur à la TSH (RTSH)

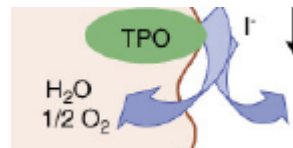


I) La TPO

1) Structure et fonction

La TPO identifiée à l'antigène microsomial en 1985

Hémoprotéine glycosylée située dans la membrane apicale des thyrocytes



Enzyme clé dans la synthèse des hormones thyroïdiennes

A l'origine des Ac anti-TPO retrouvés dans certaines MTAI (marqueur+++ de la thyroïdite d'Hashimoto)

2) Indications cliniques des Ac anti-TPO (NACB)

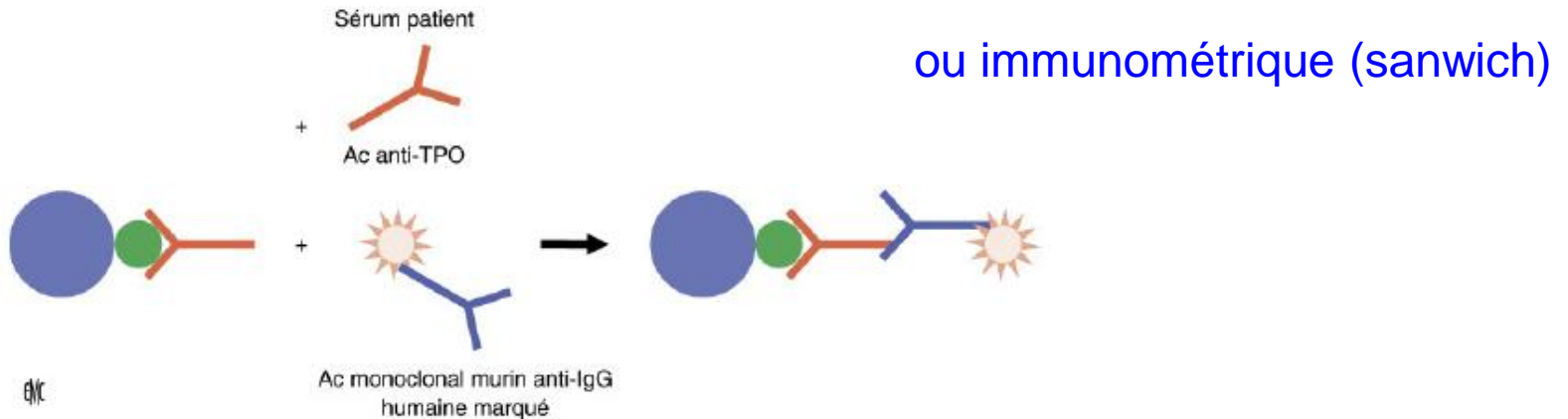
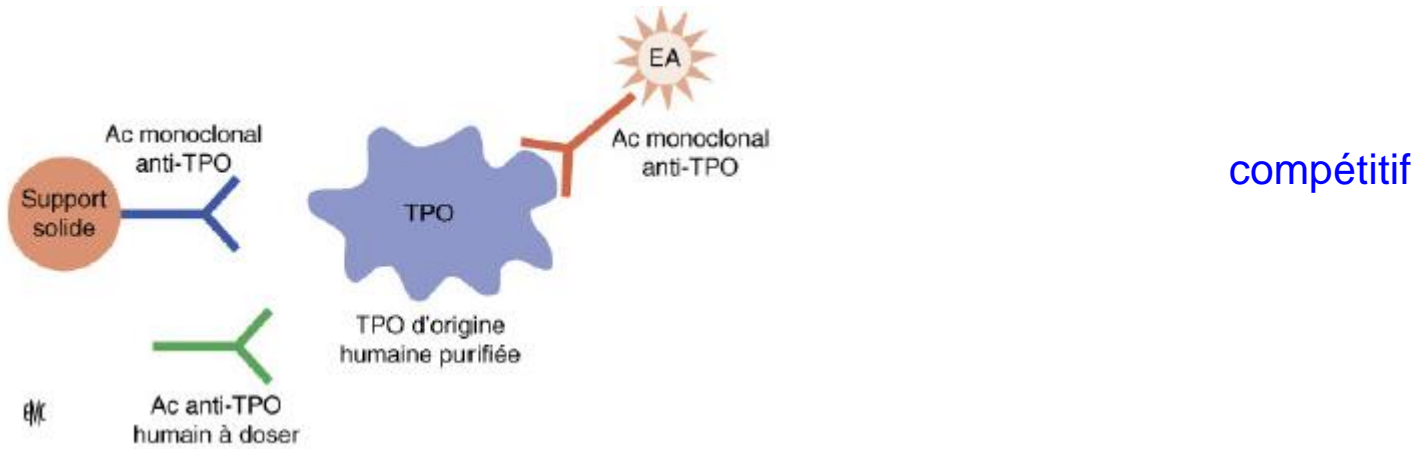
- Diagnostic ou facteur de risque de **thyroïdite Hashimoto** (prévalence > 95%)
- Si facteur de risque **d'une hypothyroïdie lors de thérapies** (IFN alpha, IL2, Lithium, amiodarone,)
- Si facteur de risque d'une **dysthyroïdie pendant la grossesse** ou risque de thyroïdite du post-partum

Présence d'Ac anti-TPO chez **5 à 10% de sujets sains**
Absence de pathogénie

3) Dosages

A) Choix des dosages

Dosages par **immunoanalyse** plus sensibles et spécifiques (hémagglutination passive définitivement abandonnée)



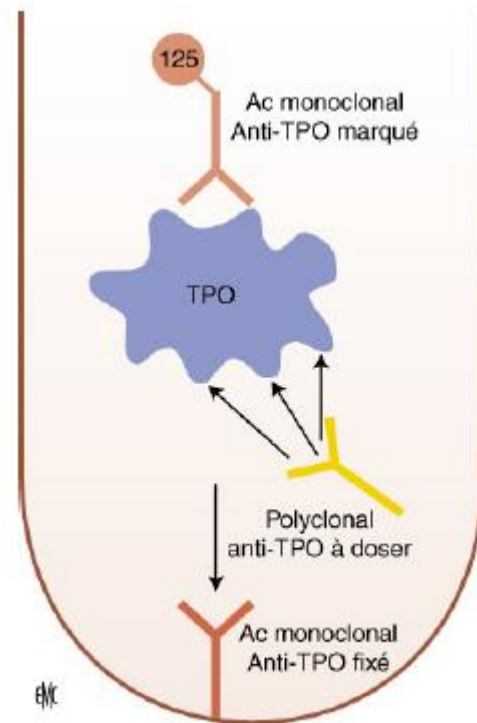
B) Difficultés

- Pureté de la TPO
- Calibration
- Pièges de l'immunoanalyse
- Valeurs de référence

- 1ère difficulté: pureté de la TPO utilisée (NACB)

Nécessité d'utiliser de la TPO humaine

- hautement purifiée native
- ou recombinante



- 2ème difficulté: Calibration du dosage

Dizaine de dosages tous calibrés sur le MRC 66/387

Préparation d'Ac anti-microsomes mal purifiée (*Graulet, IBS 2000*)

NACB: 2 classes d'immunodosages (seuil <10 ou > 10KUI/L)

- Access/DXI[®]: 4 KUI/L

- Architect[®]: 4,1 KUI/L

- Cobas/Modular/Elecsys[®]: 34 KUI/L

- ADVIA-Centaur[®]: 60 KUI/L

- Liaison[®]: 16 KUI/L

Variabilité des valeurs selon la technique utilisée

NACB: nécessité d'établir de nouvelles préparations de référence hautement purifiées pour éviter la variabilité+++

15MA08 / Anti Thyroperoxydase (UI/mL)

Limites acceptables à ± 46,2 % (Ricos souhaitable)
Statistiques robustes (algorithme A - norme ISO 13528)

Groupes techniques/pairs	Codage	Histogramme	n	Cible	CV	E/M%	Limites
ENSEMBLE DES RESULTATS	U		399	36,5	19,9		
ABBOTT Architect	RJ U4Y		72	35,7	4,6	-2,2	19,2 - 52,2
BECKMAN Access/DxI/DxC	QE		47	27,9	7,8	-23,6	15,0 - 40,8
- dont Access/Access2 - DxC 600/600i	QE ULA, DCP		4	30,0	/		
- dont DxI 600/DxI 800/DxC 660i/DxC 680i	QE UCD		42	27,7	7,7	-24,1	14,9 - 40,5
BIOMERIEUX Vidas/Mim/Vidas	DB UGV, UGW, UGT		25	32,9	9,8	-9,9	17,7 - 48,1
DIASORIN LIAISON/LIAISON XL	S8 UKW, UKV		11	39,0	7,2	6,8	21,0 - 57,0
ORGENTEC - ELISA sur ALEGRIA	OR		3	52,1	/		
ROCHE Elecsys/Modular/Cobas	RD		140	36,3	12,0	-0,5	19,5 - 53,1
- dont Elecsys / Cobas e 411	RD UWG, UWF, UWL		6	34,6	/		
- dont Modular	RD UWH		14	36,4	13,2	-0,3	19,6 - 53,2
- dont Cobas e 601/e 602	RD UWR, UWT		117	36,4	11,9	-0,3	19,6 - 53,2
ROCHE Cobas "c"	HZ DQP, DQR, DQN		3	36,0	/		
SIEMENS ADVIACentaur/ XP/CP "version optimisée"	SI U4S, U4E		49	152,1	6,8	316,7	81,8 - 222,4
SIEMENS Immulite/2000/2500	SA U4L, U4R, U4P		12	42,8	9,4	17,3	23,0 - 62,6
THERMO FISHER Kryptor	SN UCM		9	32,5	4,3	-11,0	17,5 - 47,5
Thermo Scientific "RIA"	BM		4	112,3	/		
THERMO FISHER ELIA IgG (PHADIA 100/250)	EC		8	40,5	28,0	11,0	21,8 - 59,2
THERMO FISHER ImmunoCAP sIgG (PHADIA 100/250)	ES		1	35,0	/		
TOSOH AIA	DL		12	24,2	10,7	-33,7	13,0 - 35,4
- dont AIA 1800/2000	DL UEP, UER		12	24,2	10,7	-33,7	13,0 - 35,4

- 3ème difficulté: Pièges de l'immunoanalyse

Interférences+++ : NACB

1) Effet crochet pour certaines méthodes « sandwich » (NACB)

2) Ac hétérophiles

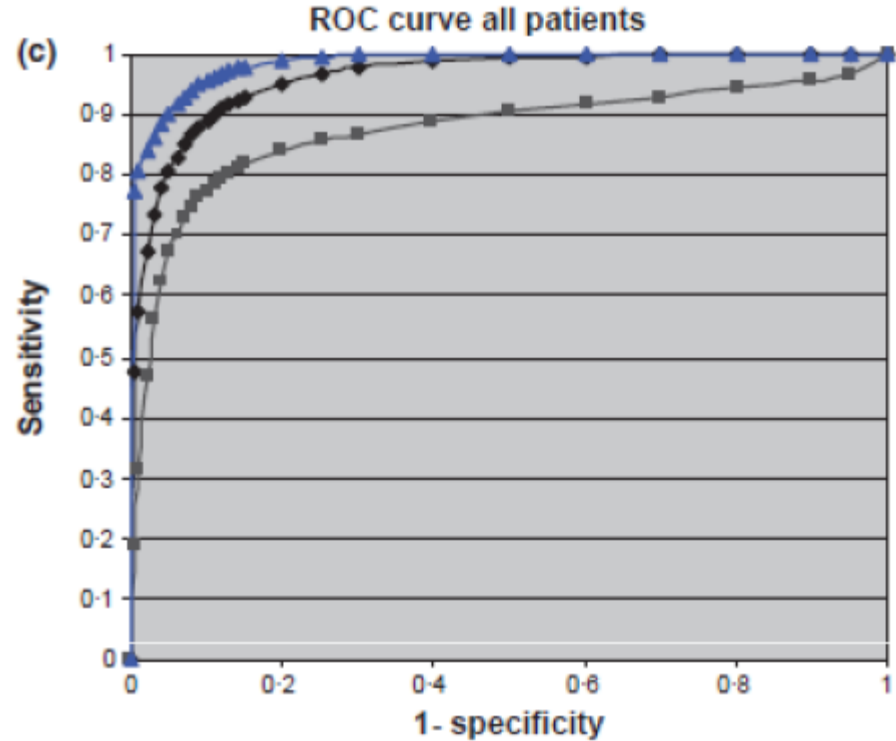
Surélévation actéfactuelle des résultats avec certaines méthodes par compétition

Després et al. Clin Chem 1998

4ème difficulté: interprétation des résultats

* Normes de référence établies (NACB)

Au moins 120 hommes
Jeunes (<30 ans)
Avec TSH normale
Sans goitre
Sans affection thyroïdienne
personnelle ou familiale
Sans pathologie autoimmune
non-thyroïdienne

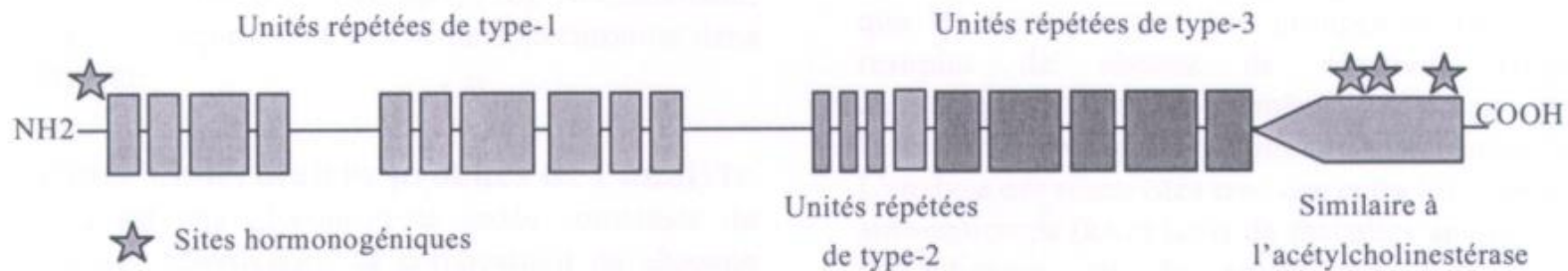
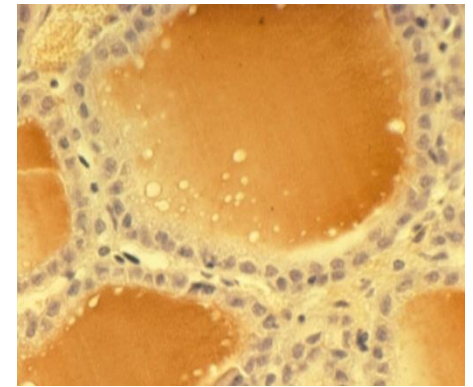


Importance pour le **seuil de positivité**
pour le **diagnostic de thyroïdite autoimmune**

II) Thyroglobuline

1) Structure et Fonction

Homodimère de 660 kDa glycosylé et iodé
formé d'unités répétées de 3 types



Représentation schématique du monomère de Tg humaine (Molina, 96)

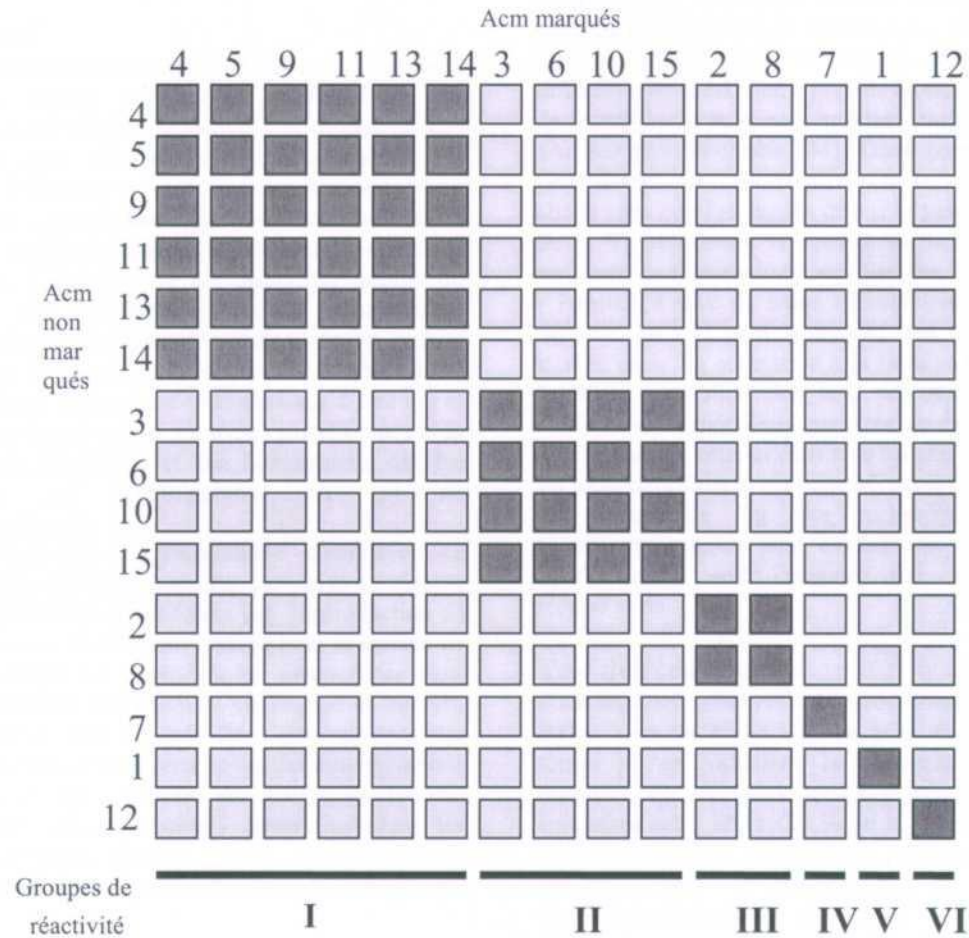
Synthétisée par les cellules thyroïdiennes puis transportée au pôle apical et stockée dans la colloïde

Matrice de la synthèse des hormones thyroïdiennes ([prohormone](#))

A l'origine des [Ac anti-Tg](#) retrouvés dans certaines MTAI

Présence d'Ac anti-Tg chez [5 à 10%](#) de sujets sains

Spécificité des anticorps



Cartographie relative de la Tg humaine (Piechaczyk, 85)

Il existe 6 régions épitopiques de la Tg mises en évidence par cartographie
Les Ac anti-Tg produits dans les MTAI reconnaissent principalement la région II (centrale)

2) Indications cliniques des Ac anti-Tg (NACB)

Marqueur d'autoimmunité thyroïdienne

- dans des régions carencées en iode
- dans les régions non carencées

Seulement chez les patients présentant des Ac anti-TPO négatifs (moins de 3% des cas)

Utilisé essentiellement pour la validation des dosages de Tg+++

3) Dosage

A) Principe

Méthode **par immunoanalyse** (abandonner l'hémagglutination passive)

- Dosages immunométriques (sandwich)
- Dosages par compétition

B) Difficultés

- Calibration
- Pièges de l'immunoanalyse
- Valeurs de référence

Calibration

- -Dizaine de dosages :Haute variabilité des résultats (bien que calibrés sur le WHO **MRC 65/93**)
- NACB : 2 classes d'immunodosages (< 10 kUI/L et >10 kUI/L)
 - Access/DXI[®] : 9 kUI/L
 - Architect[®] : 5,6 kUI/L
 - Cobas/Modular/Elecsys[®] : 115 kUI/L
 - ADVIA-Centaur[®] : 60 kUI/L
 - Liaison[®] : 100 kUI/L

NACB : utilité d'établir de nouvelles préparations de référence hautement purifiées pour éviter la variabilité

15MA08 / Anti Thyroglobuline (UI/mL)

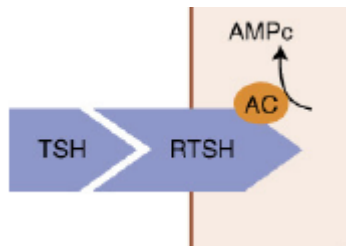
Limites acceptables à ± 27,6 % (Ricos souhaitable)
Statistiques robustes (algorithme A - norme ISO 13528)

Groupes techniques/pairs	Codage	Histogramme	n	Cible	CV	E/M%	Limites
ENSEMBLE DES RESULTATS	U		395	113,3	57,9		
ABBOTT Architect	RJ U4Y		71	31,1	9,0	-72,6	22,5 - 39,7
BECKMAN Access/DxI/DxC	QE		47	77,1	10,8	-32,0	55,8 - 98,4
- dont Access/Access2 - DxI/600i	QE ULA, DCP		4	72,3	/		
- dont DxI 600/DxI 800/DxC 660I/DxC 680i	QE UCD		42	77,4	10,3	-31,7	56,0 - 98,8
BIOMERIEUX Vidas/MiniVidas/Vidas 3	DB UGV, UGW, UGT		25	94,7	10,1	-16,4	68,6 - 120,8
DIASORIN Liaison /Liaison XL	S8 UKW, UKV		11	81,7	11,0	-27,9	59,2 - 104,2
ROCHE Elecsys/Modular/Cobas	RD		135	176,5	5,8	55,8	127,8 - 225,2
- dont Elecsys / Cobas e 411	RD UWG, UWF, UWL		8	181,3	5,9	60,0	131,3 - 231,3
- dont Modular	RD UWH		15	179,2	4,0	58,2	129,7 - 228,7
- dont Cobas e 601/e 602	RD UWR, UWT		109	175,7	5,9	55,1	127,2 - 224,2
ROCHE Cobas "c"	HZ DQP, DQR, DQN		3	175,0	/		
SIEMENS ADVIA Centaur/ XP/CP "version optimisée"	SI U4S, U4E		46	143,8	6,9	26,9	104,1 - 183,5
SIEMENS Immulite/2000/2500	SA U4L, U4R, U4P		10	39,1	16,6	-65,5	28,3 - 49,9
THERMO FISHER Kryptor	SN UCM		13	84,3	11,8	-25,6	61,0 - 107,6
Thermo Scientific "RIA"	BM		5	140,8	/		
THERMO FISHER ELIA IgG (PHADIA 100/250)	EC		9	123,1	19,1	8,6	89,1 - 157,1
THERMO FISHER ImmunoCAP sIgG (PHADIA 100/250)	ES		1	98,0	/		
TOSOH AIA	DL		12	65,8	9,0	-41,9	47,6 - 84,0
- dont AIA 1800/2000	DL UEP, UER		12	65,8	9,0	-41,9	47,6 - 84,0

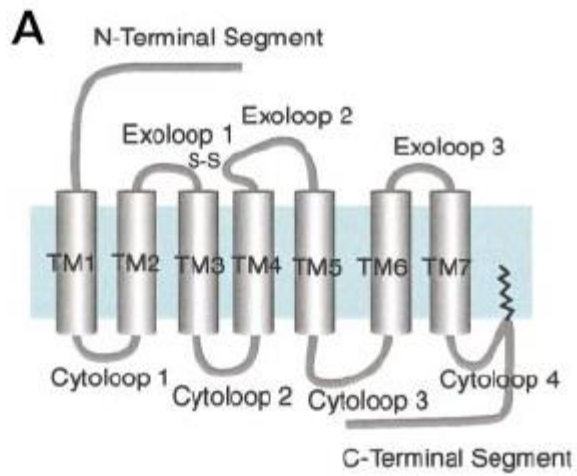
III) Le récepteur de la TSH: RTSH

1) Structure et fonction

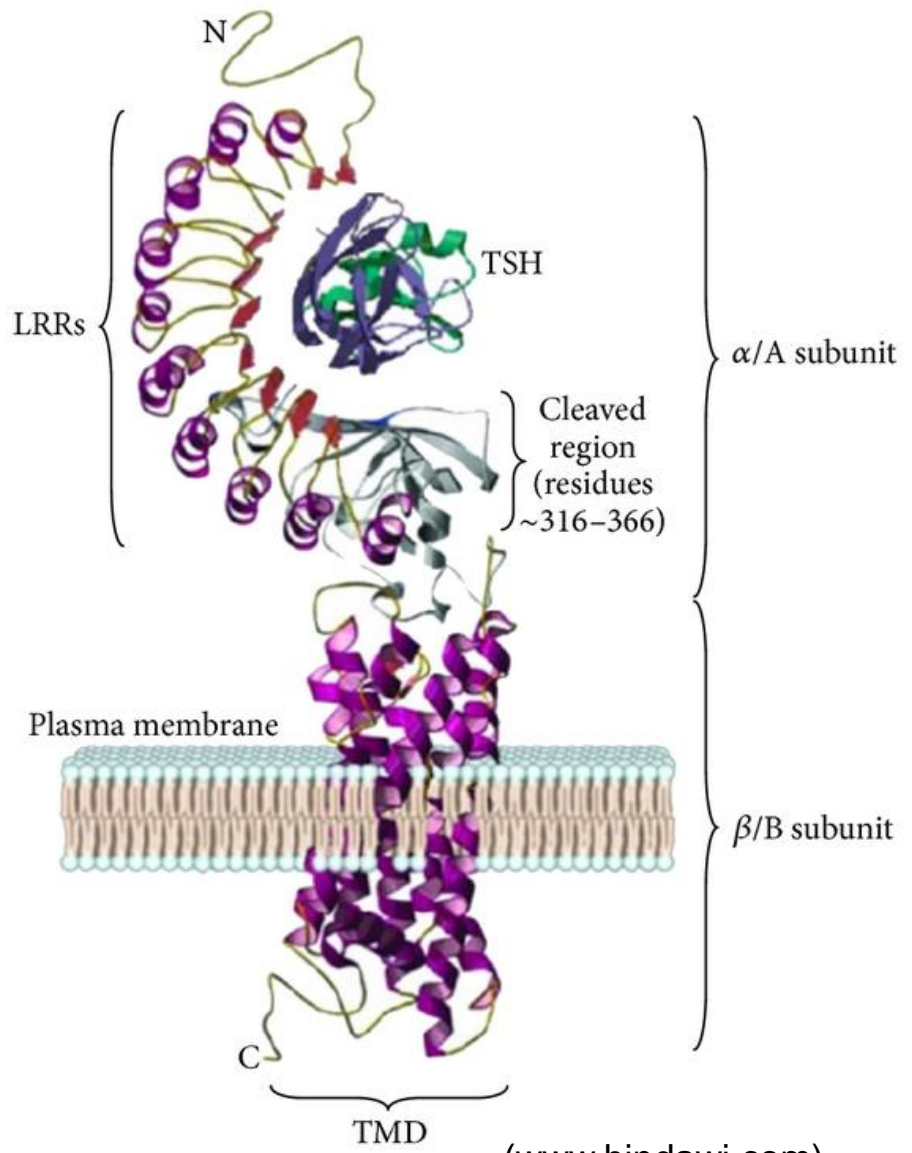
Situé au pôle baso-latéral du thyrocyte



Régulateur principal de la sécrétion hormonale
Appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G



D'après Ji TH et al J Biol Chem 1998



(www.hindawi.com)

A l'origine de deux types d'Ac anti-RTSH: stimulants et bloquants

2) Nomenclature des Ac anti-RTSH

TRAb (TSH Receptor Antibody)

Abréviation	Traduction	Méthode de dosage
TSAb	Thyroid stimulating antibody	<i>Bioassay</i> (Stimulants)
TSI	Thyroid stimulating immunoglobulin	
TBAb	Thyroid blocking antibody	Bioassay (Bloquants)
TBII	Thyroid binding inhibitory immunoglobulin	Par compétition vis à vis
TBIAb	Thyroid binding inhibitory antibody	un RTSH

TBII sont communément appelés **TRAK** (TSH-Rezeptor-Autoantikörper) par analogie à la dénomination des premières trousse de dosage commercialisées par la Société Henning (Berlin)

Permettent la mesure de la totalité des anticorps (stimulants et bloquants)

3) Indications des Ac anti-RTSH (NACB)

Leur présence caractérise la **maladie de Basedow+++**
Pathogènes+++

Doivent être prescrits

1. Diagnostic **différentiel d'une maladie de Basedow** d'autres hyperthyroïdies
2. Diagnostic **étiologique d'une orbitopathie** de type Basedowien
3. Evaluation du **risque de rechute** à l'arrêt d'un traitement de 18 mois par anti-thyroïdien de synthèse (ATS)
4. Pendant la **grossesse +++** : (TSAb et TBAb traversent la barrière foeto-maternelle)

Prise en charge d'une dysthyroïdie foétale chez une patiente

- Débutant une maladie de Basedow
- Ayant une maladie de Basedow traitée par ATS
- Ayant présenté jadis une maladie de Basedow (qu'elle ait été traitée par ATS, irathérapie ou chirurgie)

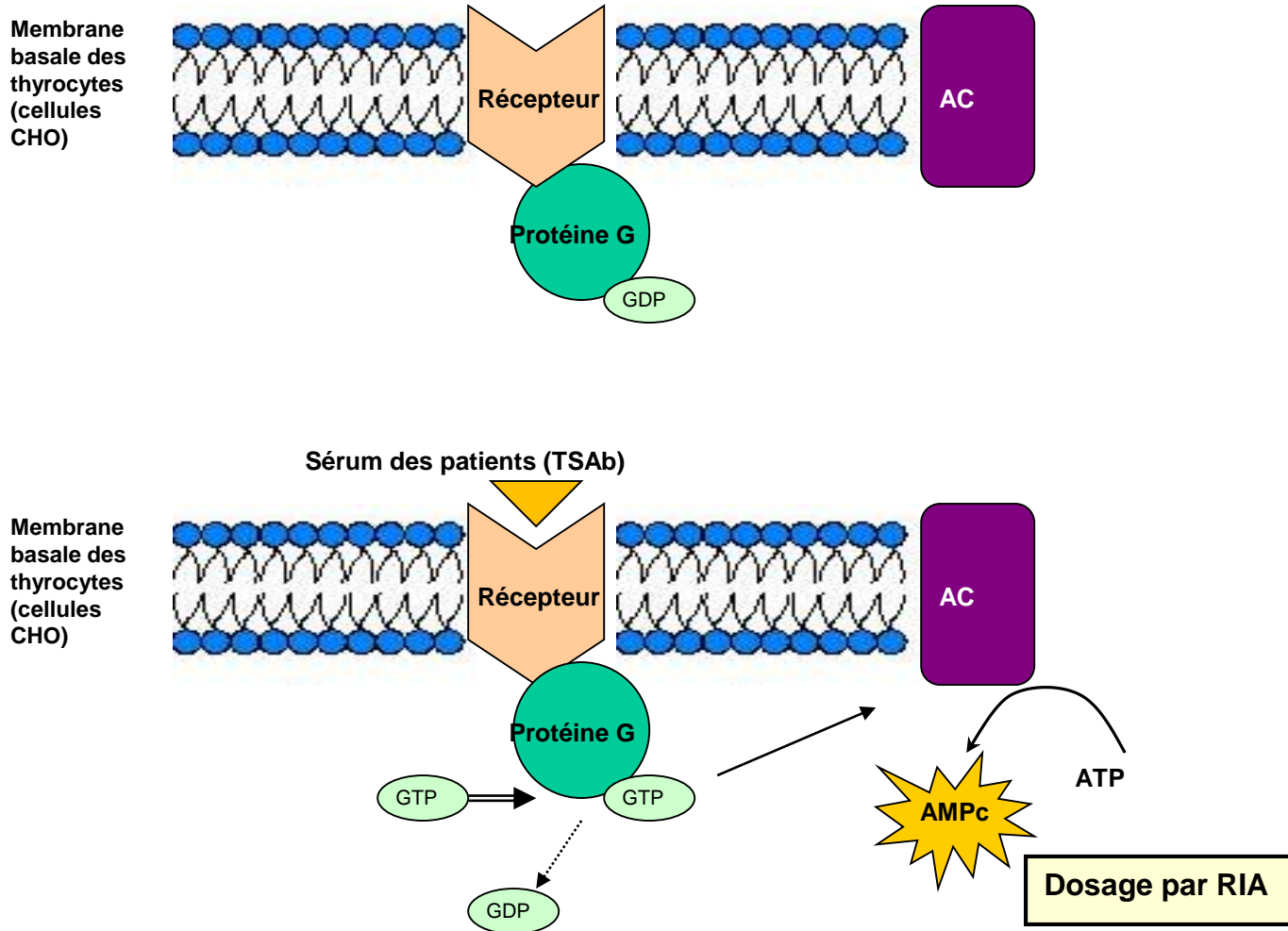
Dosages au 1^{er} et 3^{ème} trimestre de la grossesse (Répercussions délétères foétales +++)

5. **Nouveau-né**: diagnostic ou prédiction d'une maladie de Basedow néonatale (**stimulants**) ou diagnostic d'hypothyroïdie transitoire néonatale (**bloquants**)

4) Dosages des Ac anti-RTSH

a) Bioassays

Sur des lignées cellulaires (CHO) transfectées JP26/26 transfectées avec le gène du RTSH (Massart et al. Clin Chim Acta 2000 pour TSAb; Clin Chim Acta:2001 pour TBAb)



Lignées CHO transfectées avec le gène de la luciférase et utilisation d'un RTSH chimérique (Mc4): Thyretain™ receptor bioassay (Lytton JCEM 2010)

Avantages des « Bioassays »

Dosage de l'activité biologique stimulante ou bloquante (**intérêt pendant la grossesse**)

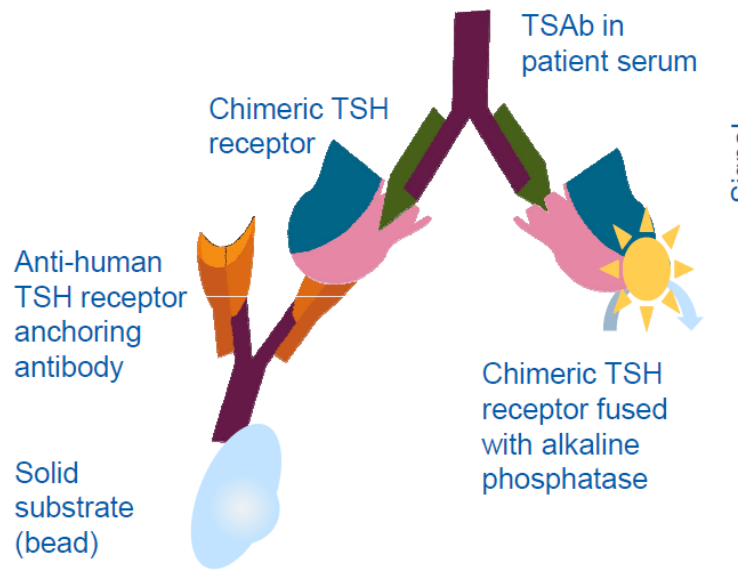
Limites

Praticabilité et difficultés liées à la culture

Laboratoires spécialisés

Perspective

The IMMULITE® 2000/XPi TSI Assay Format



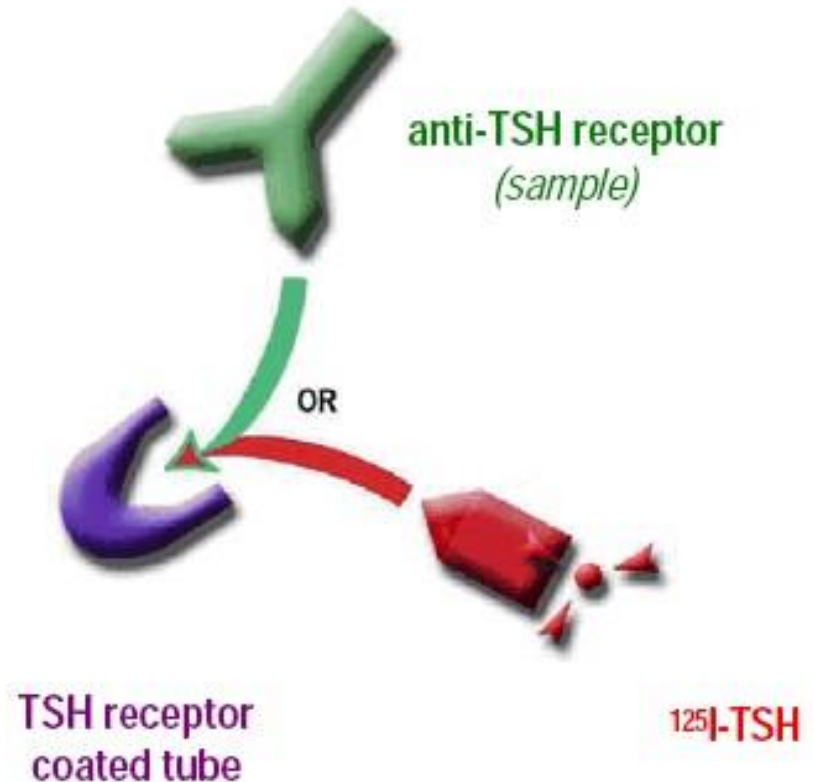
b) TBII ou TRAK

L'activité totale (stimulante et bloquante) par méthode par compétition vis-à-vis d'un RTSH

Trois générations

TRAK 1ère génération

Dosage par radiorécepteur utilisant
des membranes thyroïdiennes porcines

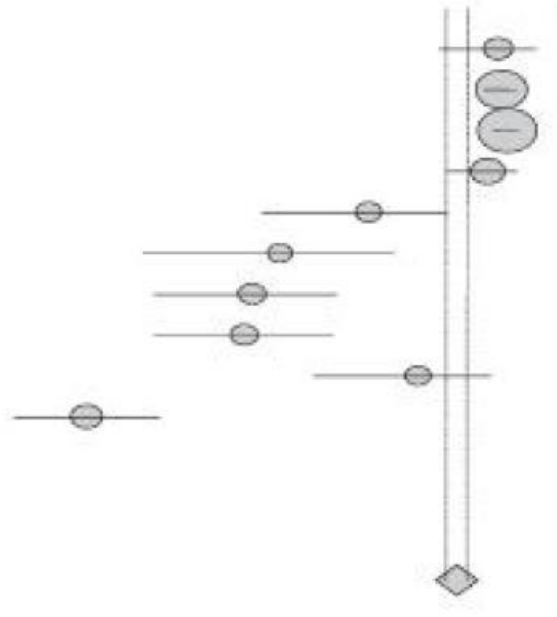


Inconvénients

- **Absence de précision** dans les faibles concentrations (CV > 15%)
(Massart et al. Clin Chem 1986)
- **Faible sensibilité clinique** dans le diagnostic de la maladie de Basedow
(absence de détection 24 à 50% des patients Basedowiens non traités)

1st generation TRAb

Illicki 1992
Mukuta 1994
Kawai 1995
Takasu 1997
Costagliola 1999
Bolton 1999
Schott 2000
Bulow Pedersen 2001
Giovanella 2001
Morgenthaler 2002



Sensitivity (95% CI)

0.931	(0.873 - 0.968)
0.934	(0.917 - 0.948)
0.940	(0.927 - 0.951)
0.921	(0.882 - 0.950)
0.802	(0.702 - 0.880)
0.714	(0.578 - 0.827)
0.687	(0.594 - 0.770)
0.679	(0.582 - 0.767)
0.851	(0.750 - 0.923)
0.523	(0.451 - 0.594)
0.890	(0.879 - 0.900)

TRAK 2ème génération (2G)

1) TRAK humain (Brahms puis Thermofischer) en 1999

R-TSH **humain**

TSH marquée (RIA)

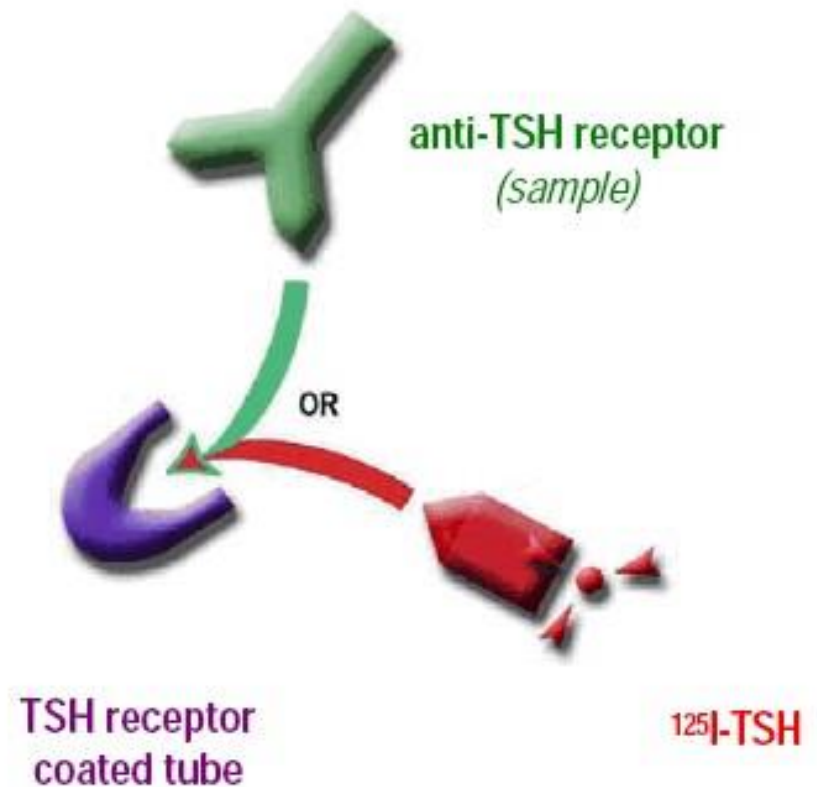
ou sur Kryptor™ Compact plus (TRACE)

2) TRAK porcin

R-TSH **porcin** fixé sur support solide

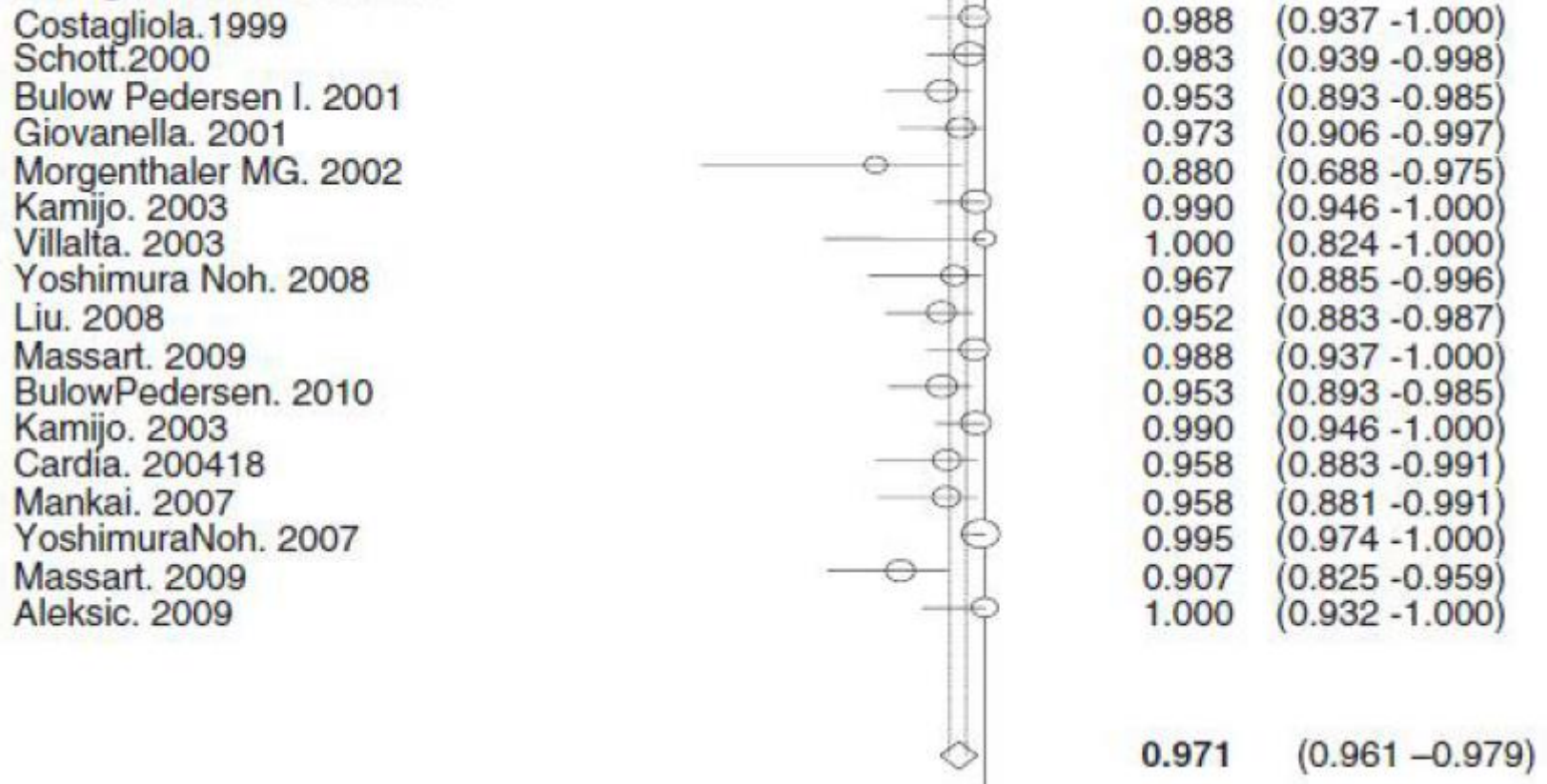
TSH radiomarquée (pRRA d'Immunotech, Beckman-Coulter, Kronus.....)

TSH biotinylée (TECOmedical,)

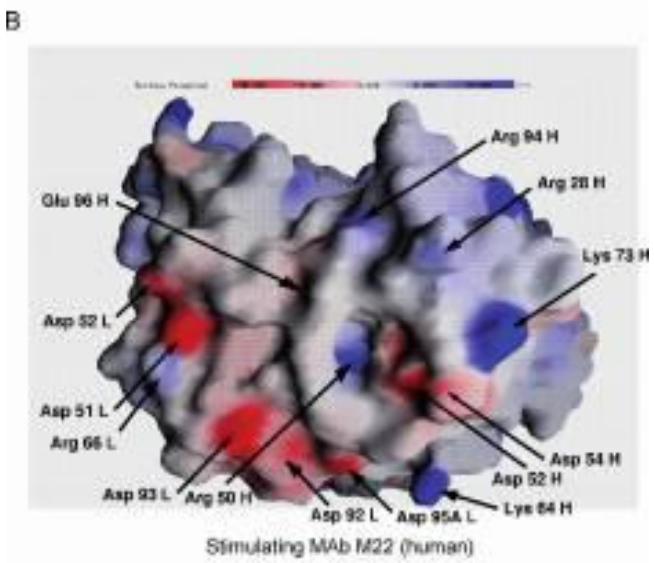
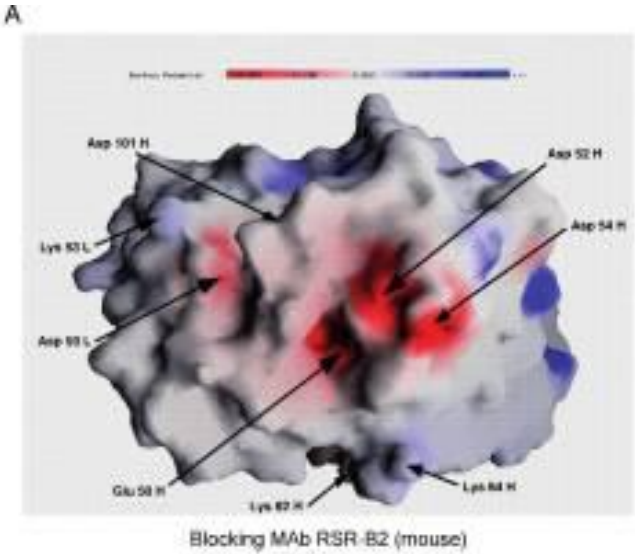


Amélioration+++ de la sensibilité clinique (proche de 100%)

2nd generation TRAb



Ac anti-RTSH 3ème génération (3G) utilisant un Ac monoclonal stimulant :M22
(Ac monoclonal M22 :Sanders et al; Thyroid 2002)



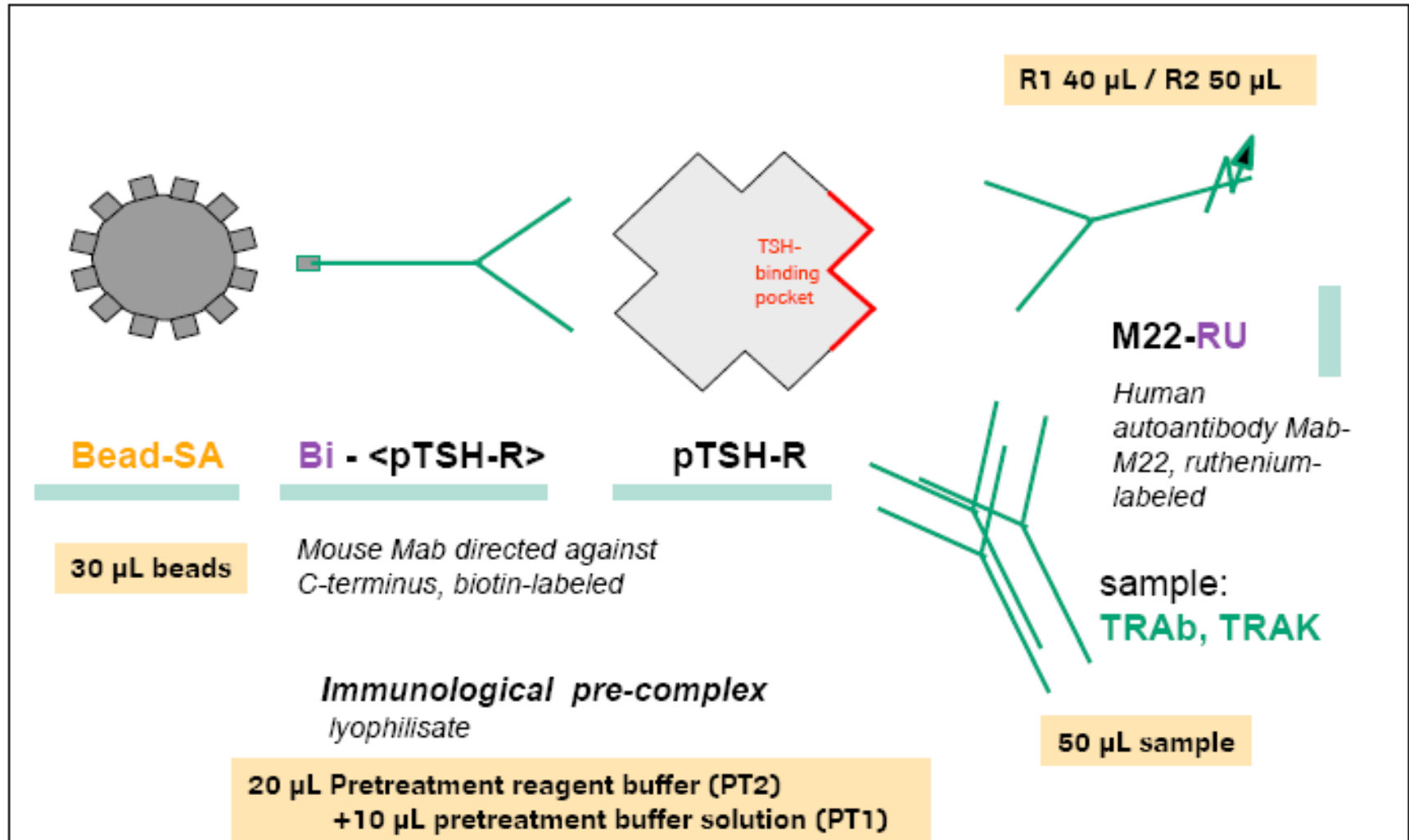
Avantages présumés des dosages TRAK 3G utilisant le M22

1) Intérêt chez les patients présentant une orbitopathie sans hyperthyroïdie (*Rees-Smith et al, Thyroid 2004*)

AVIS CONTROVERSESES

2) Rapidité et praticabilité d'un dosage automatisé (Cobas[®]) (*Yoshimura Noh et al. Thyroid 2008*)

M22 marqué au ruthénium (Méthode ECLIA, Roche)



Dosage ELISA
Compétition envers un
récepteur porcine
M22 biotinylé ELISA: Medipan

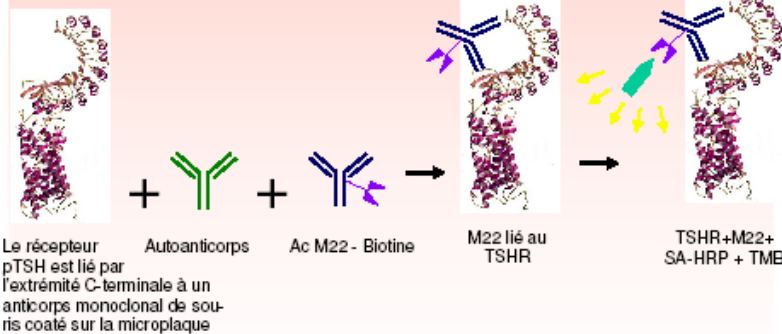


Kit ELISA TRAb clone

Détection des autoanticorps anti-récepteur
de la Thyrotropine (TSH)

- Dosage de 3ème génération
- Améliore la prédiction des rechutes de l'hyperthyroïdie dans la maladie de Basedow
- Utilisation d'anticorps stimulant humain M22
- Sensibilité du dosage de 0,22 UI/l
- Adapté pour une utilisation sur automates
- Barrettes sécables, pratiques pour des petites séries et pour un rendement efficacité/coût maximal.

Principe du dosage

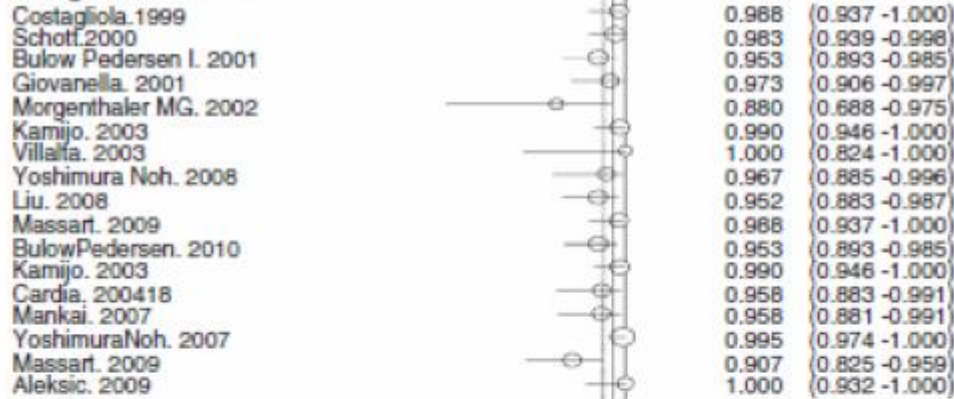


M22 est un anticorps monoclonal **STIMULANT HUMAIN**
(remplace la TSH porcine utilisée dans les dosages conventionnels)

MEDIZYM[®]

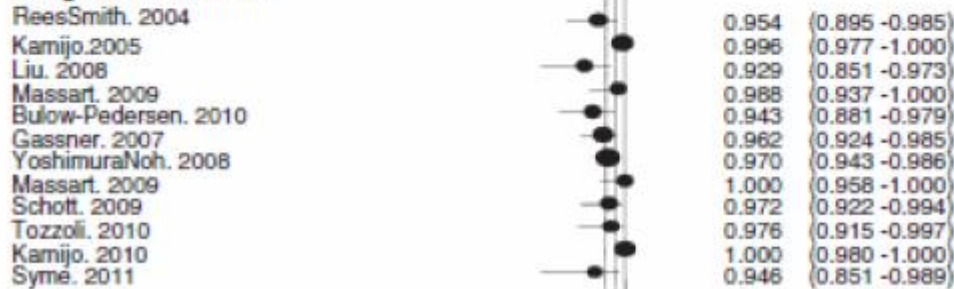
Haute sensibilité clinique **comme le TRAK 2G**

2nd generation TRAb



0.971 (0.961 -0.979)

3rd generation TRAb



0.974 (0.965 -0.981)

- 1^{ère} difficulté : Pièges de l'immunoanalyse

Interférences+++:

Ac hétérophiles

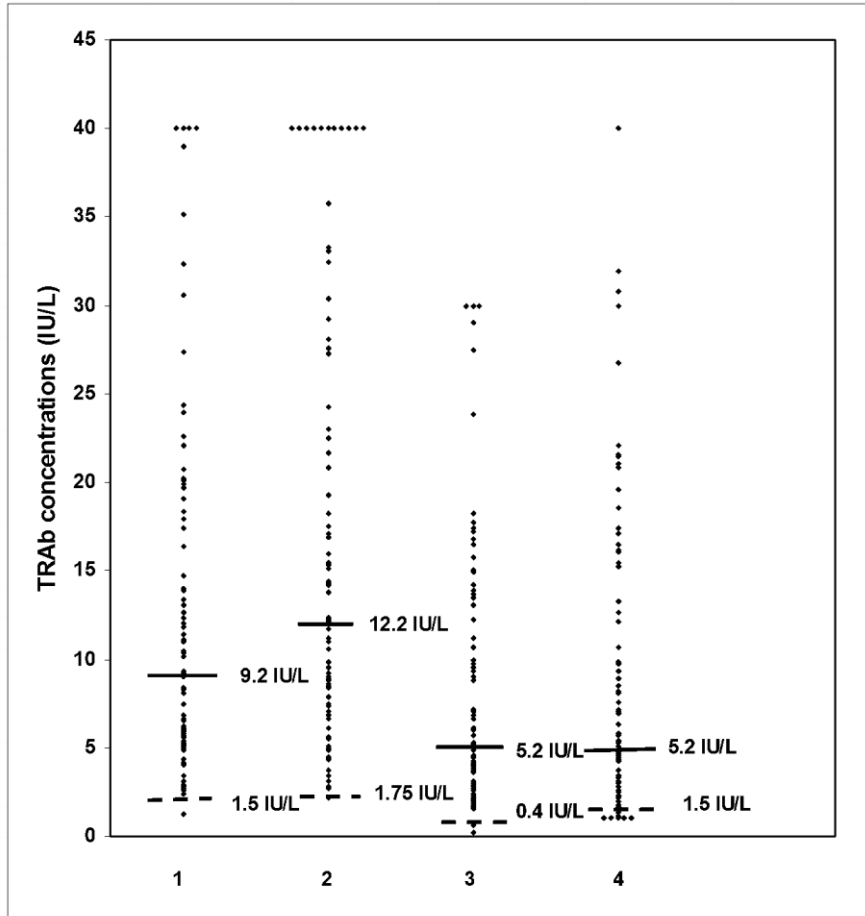
Induisent une surélévation actéfactuelle des résultats avec certaines méthodes

Ex: Ac anti-streptavidine

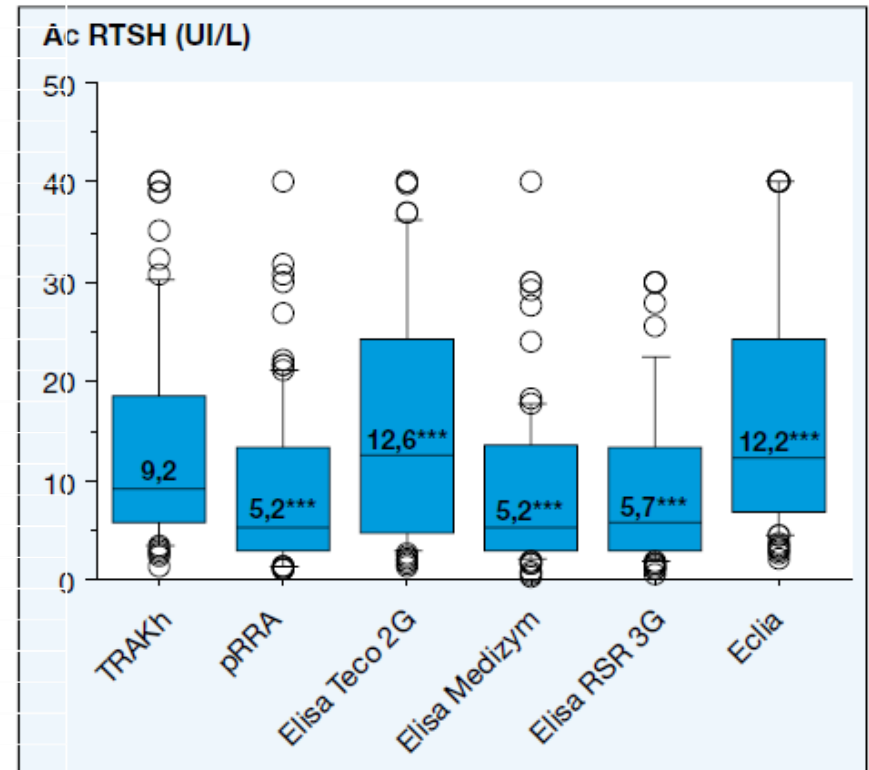
(diagnostic erroné de maladie de Basedow et traitement inapproprié)

Peltier et al Clin Chem Lab Med 2015

2^{ème} Difficulté : liée à la calibration



Massart et al. Clin Chem 2008



Massart et al. Ann Biol Clin 2009

Dosages TRAK 2G et 3G effectués chez 86 Basedowiens non traités

Variabilité des résultats : Médiane variant de **5,2 à 12,6 UI/L**

Tableau 1. Principe et caractéristiques analytiques données par les fournisseurs des six méthodes de dosage des Ac anti-RTSH.

Dosage	TRAKh	pRRA	Elisa Teco 2G	Elisa Medzym	Elisa RSR 3G	Eclia
Principe	Compétition (TSH radiomarquée)	Compétition (TSH radiomarquée)	Compétition (TSH biotinylée)	Compétition (M22 biotinylé)	Compétition (M22 biotinylé)	Compétition (M22 couplé au ruthénium)
Génération	2G	2G	2G	3G	3G	3G
Détection	Radioactivité	Radioactivité	EIA	EIA	EIA	ECL
Récepteur	Humain	Porcin	Porcin	Porcin	Porcin	Porcin
Standard	NIBSC 90/672	NIBSC 90/672	NIBSC 90/672	NIBSC 90/672	NIBSC 90/672	NIBSC 90/672
Limite de détection (U/L)	0,3	0,3	0,21	0,16	0,12	0,3
Sensibilité fonctionnelle (UI/L)	0,9	1	0,85	0,22	0,22	0,9
Seuil de positivité (U/L)	1,5 (zone grise : 1-1,5)	1,5 (zone grise : 1-1,5)	2 (zone grise : 1-2)	0,4 (zone grise : 0,3-0,4)	0,4	1,75

EIA : immunoenzymométrie ; ECL : électrochimiluminescence.

Massart et al, Ann Biol Clin 2009

Confirmation par courbes de ROC des cut-offs fabricants variant de **0,4 à 1,75 UI/L**

Conséquences de la variabilité:

Suivi des grossesses+++: même dosage de TRAK 2G ou 3G au 1^{er} et 3^{ème} trimestre

NACB: Nécessité d'utiliser un étalon hautement purifié

Chris Burn (National Institute for Biological Standards and Control) 2010

The aims of the study were, therefore:

- To calibrate the candidate standard (08/204) relative to the 1st IS for TSAb (90/672).
- To demonstrate the suitability of the preparation 08/204 to serve as the 2nd IS for TSAb by examining its behaviour in receptor binding assays and bioassay systems.
- To assess the relationships among the existing local standards and the proposed IS.
- To determine the stability of the preparation 08/204 by comparing them with ampoules that have been subjected to accelerated thermal degradation.



2013:Nouvel étalon le 08/204

**WHO International Standard
2nd International Standard for Thyroid Stimulating Antibody
NIBSC code: 08/204
Instructions for use
(Version 2.0, Dated 28/03/2013)**

1. INTENDED USE

The World Health Organization (WHO) Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) has recognized (2006) the need for a replacement International Standard for Thyroid-stimulating antibody (TSAb) for the calibration of TSAb assays. The 2nd IS, coded 08/204 was established at the 61st Meeting of the ECBS. This material replaces the 1st IS coded 90/672, which is discontinued.

CONCLUSION

Difficultés des dosages des marqueurs de l'auto-immunité

- méthodes utilisées
- interprétation des résultats

Fabricants: Suivre les recommandations de la NACB

Biologistes: Dialogue avec les cliniciens