

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



Année 2006

THESE N° 345/1

**EVALUATION D'UN AUTOMATE MULTIPARAMETRIQUE  
L'UniCel DxI 800® :  
APPLICATION A L'ETUDE DE L'AUTOIMMUNITE GASTRIQUE  
CHEZ DES PATIENTS PRESENTANT  
DES DYSTHYROÏDIES AUTOIMMUNES**

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE**

**du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement

le 15 décembre 2006 à Bordeaux

par

**Stéphanie MOREL**

Née le 19 décembre 1980 à Lyon

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 151862 7

**JURY**

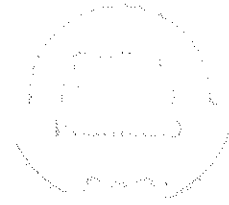
Monsieur Jean-Paul POMETAN, Professeur  
Madame Laurence BORDENAVE, Professeur  
Monsieur Jean-Benoît CORCUFF, Docteur  
Madame Agnès GEORGES, Docteur  
Madame Jeanne MOREAU, Docteur

Président  
Juge  
Juge  
Juge  
Juge



**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**FACULTE DE PHARMACIE**



**Année 2006**

**THESE N° 345**

**EVALUATION D'UN AUTOMATE MULTIPARAMETRIQUE**

**L'UniCel DxI 800® :**

**APPLICATION A L'ETUDE DE L'AUTOIMMUNITE GASTRIQUE**

**CHEZ DES PATIENTS PRESENTANT**

**DES DYSTHYROÏDIES AUTOIMMUNES**

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE**

**du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement

le 15 décembre 2006 à Bordeaux

par

**Stéphanie MOREL**

Née le 19 décembre 1980 à Lyon

**JURY**

Monsieur Jean-Paul POMETAN, Professeur  
Madame Laurence BORDENAVE, Professeur  
Monsieur Jean-Benoît CORCUFF, Docteur  
Madame Agnès GEORGES, Docteur  
Madame Jeanne MOREAU, Docteur

Président  
Juge  
Juge  
Juge  
Juge



# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

---

### DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

### ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

### PROFESSEURS

**BENEYTOUT** Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

**BOTINEAU** Michel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

**BROSSARD** Claude

PHARMACIE GALENIQUE

**BUXERAUD** Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

**CARDOT** Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

**CHULIA** Albert

PHARMACOGNOSIE

**CHULIA** Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

**DELAGE** Christiane

CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE

**DESMOULIERE** Alexis

PHYSIOLOGIE

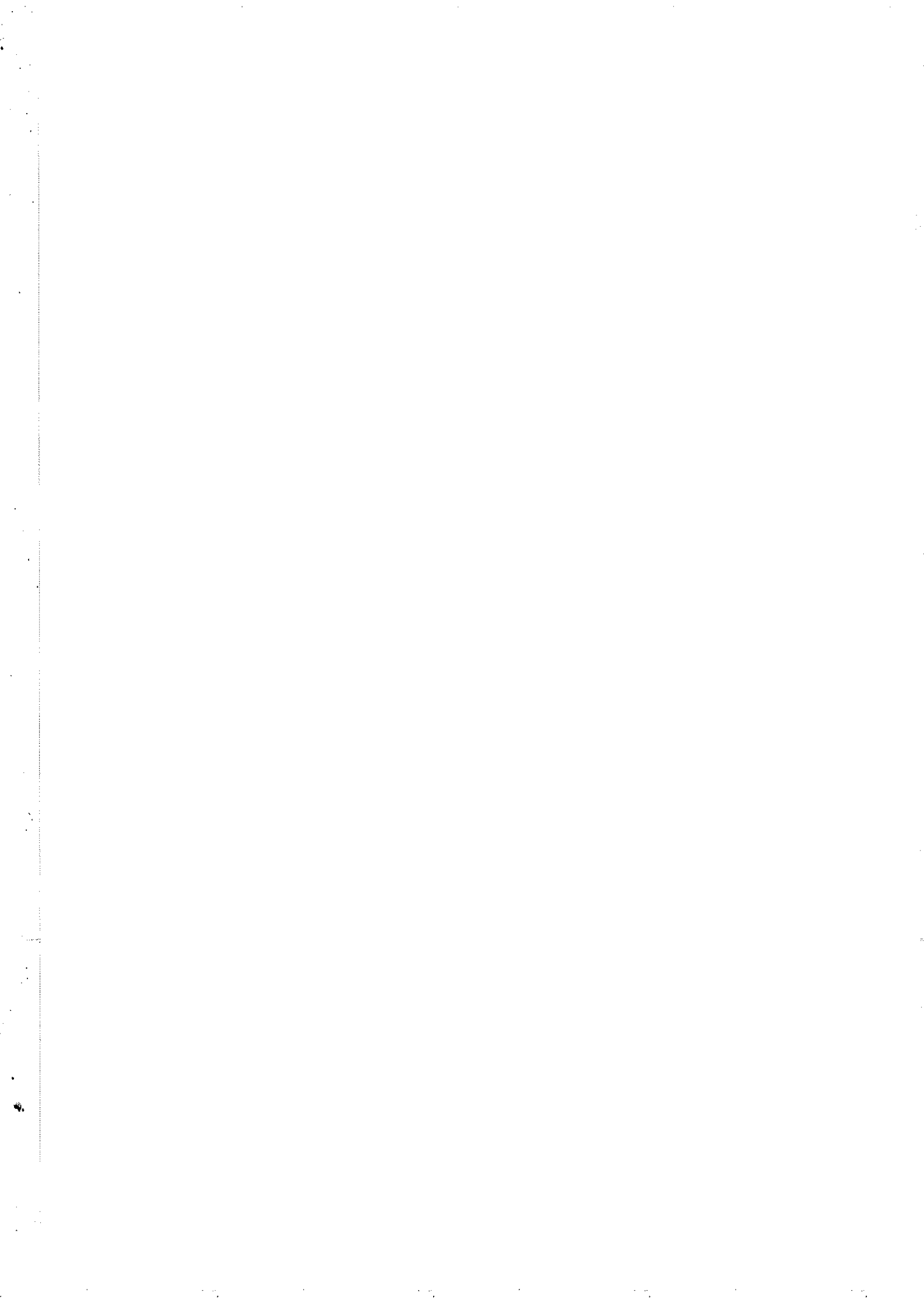
**DREYFUSS** Gilles

PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE

**DUROUX** Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE





<b>HABRIOUX</b> Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
<b>UDART</b> Nicole	PHARMACODYNAMIE
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

### **MAITRES DE CONFERENCES**

<b>ALLAIS</b> Daovy	PHARMACOGNOSIE
<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
<b>CARDI</b> Patrice	PHYSIOLOGIE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>JAMBUT</b> Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE





<b>LAGORCE</b> Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE (en disponibilité)
<b>LARTIGUE</b> Martine	PHARMACODYNAMIE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	IMMUNOLOGIE
<b>PARTOUCHE</b> Christian	PHYSIOLOGIE
<b>POUGET</b> Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOMATHEMATIQUES
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOMATHEMATIQUES
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOMATHEMATIQUES

**PROFESSEUR CERTIFIE**

**MARBOUTY** Jean-Michel ANGLAIS

**ATER A MI-TEMPS**

**BEGAUD-GRIMAUD** Gaëlle Sce M. le Prof. BOTINEAU



**COURTIOUX** Bertrand

Sce . le Prof. DREYFUSS

**LE JEUNE** Anne-Hélène

Sce le Prof.BOTINEAU

**MOUSSEAU** Yoanne

Sce les Prof. DREYFUSS et MOESCH

**SAMARA** Maha

Sce Mme le Prof. OUDART

**YAHIAOUI** Samir

Sce M. le Prof. BUXERAUD





## **A nos juges**

### **Madame le Professeur Laurence BORDENAVE**

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux

Laboratoire de Biophysique et INSERM U443, Université de Bordeaux II

Vous nous avez accueillie dans votre service et vous nous avez permis de réaliser ce travail.

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de le juger.

Nous vous prions de recevoir nos sincères remerciements.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

### **Monsieur le Docteur Jean-Benoît CORCUFF**

Docteur en médecine

Praticien Hospitalier, Maître de conférences universitaire

Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux

Vous nous avez fait l'honneur de diriger ce travail.

Nous avons apprécié votre disponibilité, votre patience, votre écoute et vos remarques constructives qui ont accompagné la réalisation de ce travail.

Veillez recevoir la preuve de notre profonde estime et de notre respect.





**Madame le Docteur Agnès GEORGES**

Docteur en Pharmacie

Praticien Hospitalier

Service de Médecine Nucléaire, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux

Nous vous remercions de nous avoir confiée ce travail et de nous avoir conseillée tant dans l'élaboration que dans la conception de cette thèse.

Vos compétences, votre disponibilité et votre gentillesse nous ont permis de progresser et d'aborder ce travail avec un réel plaisir.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de participer à ce jury.

Veuillez recevoir nos plus sincères remerciements et notre reconnaissance.

**Madame de Docteur Jeanne MOREAU**

Docteur en Pharmacie

Praticien Hospitalier, Maître de conférences universitaire

Service de Biochimie, Hôpital Dupuytren, CHU de Limoges

Laboratoire d'Immunologie, Université de Limoges

Nous vous sommes reconnaissant d'accepter de juger ce travail.

C'est pour nous un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury.

Nous vous témoignons notre grande considération.



## **A notre président de thèse**

**Monsieur le Professeur Jean-Paul POMETAN**

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Chef de service  
Pharmacie, Hôpital Saint-André, CHU de Bordeaux  
Laboratoire de Chimie Organique, Université de Bordeaux

Vous nous faites un très grand honneur en présidant ce jury de thèse.

Nous vous remercions de l'intérêt que vous portez à ce travail.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.



A Monsieur le Professeur Feuillard, chef de service du Laboratoire d'Hématologie du  
CHU de Limoges,

A Monsieur le Professeur Denis, chef de service du Laboratoire de Bactériologie du CHU  
de Limoges,

A Monsieur le Professeur Magnaval, chef de service du Laboratoire de Parasitologie,  
Hôpital Rangueil Toulouse,

A Monsieur le Professeur Chap, chef de service du Laboratoire de Biochimie, Hôpital La  
Grave Toulouse,

A Madame le Professeur Bébéar, chef de service du Laboratoire de Bactériologie, Hôpital  
Haut-Lévêque Bordeaux,

A Monsieur le Professeur Ducassou, chef du service de Médecine Nucléaire, Hôpital  
Haut-Lévêque Bordeaux,

Vous nous avez accueillie dans votre service au cours de notre internat, soyez assurés de  
notre gratitude et de notre profond respect.



A mes grands-parents adorés,

A mes parents, ma sœur Blandine, mon frère Grégoire, ma belle sœur Estelle, je vous remercie pour votre soutien et votre patience durant toutes ces années, que ce travail soit le témoignage de mon amour.

A ma famille avec toute mon affection

A Sonia, ma meilleure amie

A Mouna, Véronique, ma « tata Sandrine », Fabienne et Stéphanie, merci d'être toujours là.

A mes collègues et amis internes

A mes amis de la Faculté de Pharmacie de Lyon

A Madame Françoise Bienvenu, Praticien Hospitalier au laboratoire d'Immunologie à l'Hôpital Lyon Sud, vous m'avez guidée durant mon externat et ma cinquième année hospitalo-universitaire avec une grande humanité, je vous en remercie, que ce travail soit l'expression de mon profond respect.

Merci à Monsieur Vitiello, Dominique et Corinne, qui m'ont fait découvrir le monde merveilleux de l'officine.





A Marie-France et Hélène, en souvenir des après-midi « T3, T4 », merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre soutien au cours de la réalisation de ce travail.

A Hélène, Laurence, Dominique et Marie-Hélène qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Au Docteur Karine De Bosredon, je vous remercie pour votre aide et vos conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

A Stéphanie et Nassima, merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre soutien.

A l'ensemble du personnel du service de Médecine Nucléaire de l'Hôpital Haut-Lévêque, ces six mois en votre compagnie furent un réel plaisir.

Je dédie également ce travail à toutes les personnes avec qui j'ai travaillées au cours de mon externat et de mon internat avec une spéciale dédicace pour Claude et Jean-Pierre avec qui « ça a toujours été possible » !!!!

Je tiens également à remercier la société Beckman Coulter qui a mis à la disposition du laboratoire le DxI®, et qui nous a fourni gracieusement les réactifs pour la réalisation de cette étude.



# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	p 17
<b>CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	p 19
<b>I- <u>LA DYSIMMUNITE THYROÏDIENNE</u></b>	p 20
<b>I.1- L'exploration biologique de la fonction thyroïdienne</b>	p 20
<b>I.1.1- Le bilan thyroïdien</b>	p 20
I.1.1.1- Dosage de la TSH	p 20
a- <i>Méthode de dosage</i>	p 20
b- <i>Causes d'erreur, artéfacts analytiques</i>	p 22
I.1.1.2- Dosage des hormones libres	p 24
a- <i>Les différentes méthodes de dosage</i>	p 25
b- <i>Interférences analytiques</i>	p 27
I.1.1.3- Le bilan immunologique thyroïdien	p 30
a- <i>Les différents autoanticorps et intérêts cliniques</i>	p 30
b- <i>Le dosage des anticorps anti-thyroïdiens</i>	p 34
<b>I.1.2- Les recommandations de consensus</b>	p 36
<b>I.1.3- Les variations du bilan biologique thyroïdien</b>	p 37
I.1.3.1- Lors d'hyperthyroïdie	p 37
I.1.3.2- Lors d'hypothyroïdie	p 38
<b>I.2- Maladies thyroïdiennes autoimmunes</b>	p 38
<b>I.2.1- Les maladies thyroïdiennes autoimmunes spontanées</b>	p 39
I.2.1.1- Thyroïdites lymphocytaires chroniques	p 39
a- <i>Maladie de Hashimoto</i>	p 39
b- <i>Thyroïdite lymphocytaire des adolescents</i>	p 39
c- <i>Thyroïdite atrophique (myxoedème primitif)</i>	p 40
d- <i>Hypothyroïdies infra cliniques</i>	p 40
I.2.1.2- Thyroïdites lymphocytaires biphasiques	p 40



a-	<i>Thyroïdite silencieuse</i>	p 40
b-	<i>Thyroïdite du post-partum</i>	p 40
I.2.1.3-	Maladie de Basedow	p 41
I.2.1.4-	Les formes mixtes : « Hashitoxicose »	p 42
<b>I.2.2-</b>	<b>Maladies thyroïdiennes autoimmunes iatrogènes</b>	p 42
I.2.2.1-	Iode	p 42
I.2.2.2-	Le lithium	p 42
I.2.2.3-	Cytokines et immunothérapies	p 43
I.2.2.4-	Allogreffe médullaire	p 43
I.2.2.5-	Irradiation thyroïdienne	p 43
<b>I.2.3-</b>	<b>Les polyendocrinopathies autoimmunes (PEA)</b>	p 44
<b>I.2.4-</b>	<b>Pathogénie des maladies autoimmunes de la thyroïde</b>	p 44
I.2.4.1-	Facteurs génétiques	p 44
I.2.4.2-	Facteurs environnementaux	p 45
a-	<i>Les infections</i>	p 45
b-	<i>Facteurs métaboliques nutritionnels et hormonaux</i>	p 45
c-	<i>Stress et facteurs psychologiques</i>	p 45
I.2.4.3-	Immunité humorale	p 46
I.2.4.4-	Immunité cellulaire	p 46
<b>II-</b>	<b><u>DYSIMMUNITE GASTRIQUE: MALADIE DE BIERMER</u></b>	p 48
<b>II.1-</b>	<b>Epidémiologie</b>	p 48
<b>II.2-</b>	<b>Gastrite autoimmune</b>	p 49
<b>II.2.1-</b>	<b>La lésion gastrique</b>	p 49
II.2.1.1-	Macroscopie	p 49
II.2.1.2-	Microscopie	p 49
<b>II.2.2-</b>	<b>Pathogénie de la gastrite autoimmune</b>	p 50
II.2.2.1-	Les anticorps anti-cellules pariétales	p 50
II.2.2.2-	Les anticorps anti-facteur intrinsèque	p 51
<b>II.3-</b>	<b>La carence en vitamine B12</b>	p 52
<b>II.3.1-</b>	<b>Rappels sur la vitamine B12 ou cobalamine</b>	p 52
II.3.1.1-	Sources et besoins	p 52
II.3.1.2-	Métabolisme de la vitamine B12	p 52



<b>II.3.2-</b>	<b>Etiologies des carences en vitamine B12</b>	p 53
<b>II.3.3-</b>	<b>Rôle de la vitamine B12</b>	p 54
<b>II.4-</b>	<b>Manifestations cliniques de la maladie de Biermer</b>	p 54
<b>II.5-</b>	<b>Diagnostic de la maladie de Biermer</b>	p 55
<b>II.5.1-</b>	<b>Diagnostic de la carence en vitamine B12</b>	p 55
II.5.1.1-	Signes hématologiques d'une anémie mégaloblastique	p 55
a-	<i>L'hémogramme</i>	p 55
b-	<i>Le frottis</i>	p 55
c-	<i>Le myélogramme</i>	p 55
II.5.1.2-	Signes biochimiques	p 56
a-	<i>Le bilan d'hémolyse</i>	p 56
b-	<i>Dosage de la vitamine B12</i>	p 56
c-	<i>Dosages des folates sériques et érythrocytaires</i>	p 57
d-	<i>Dosages de deux métabolites: homocystéine et acide méthylmalonique</i>	p 57
e-	<i>Test de dU suppression</i>	p 57
<b>II.5.2-</b>	<b>Diagnostic étiologique du déficit en vitamine B12</b>	p 58
II.5.2.1-	Mise en évidence de la gastrite fundique	p 58
a-	<i>Méthode directe</i>	p 58
b-	<i>Méthodes indirectes</i>	p 58
II.5.2.2-	Le test de Schilling	p 59
II.5.2.3-	Diagnostic biologique étiologique	p 60
a-	<i>Dosage gastrique du facteur intrinsèque</i>	p 60
b-	<i>Diagnostic immunologique</i>	p 60
<b>II.5.3-</b>	<b>Problèmes diagnostiques</b>	p 62
<b>II.6-</b>	<b>Traitement et surveillance</b>	p 63





**EVALUATION D'UN AUTOMATE MULTIPARAMETRIQUE  
APPLICATION A L'ETUDE DE L'ASSOCIATION DYSIMMUNITE  
THYROIDIENNE-DYSIMMUNITE GASTRIQUE** p 64

**I- PRESENTATION DE L'AUTOMATE : l'UniCel DXI 800®** p 66

**I.1- Rappel sur la chimiluminescence** p 66

**I.2- L'UniCel DxI 800 ®** p 66

**II- METHODES STATISTIQUES** p 68

**III- ETUDE ANALYTIQUE DU BILAN THYROÏDIEN** p 69

**III.1- Techniques de dosage du DxI ®** p 69

**III.1.1- Dosage de la TSH** p 69

**III.1.2- Dosage de la T4l** p 69

**III.1.3- Dosage de la T3l** p 70

**III.2- Techniques radioimmunologiques utilisées au laboratoire** p 70

**III.2.1- Dosage IRMA de la TSH** p 70

**III.2.2- Dosage RIA la T4l** p 70

**III.2.3- Dosage RIA de la T3l** p 71

**III.3- Résultats** p 71

**III.3.1- Comparaison TSH DxI®/ TSH IRMA Immunotech®** p 71

**III.3.2- Comparaison T4l DxI®/ T4l RIA Immunotech®** p 74

**III.3.3- Comparaison T3l DxI®/ T3l RIA Immunotech®** p 75

**III.3.4- Test de précision de la T4l et T3l sur le DxI®** p 77

**III.4- Discussion** p 77



<b>IV- <u>ETUDE ANALYTIQUE DE L'AUTOIMMUNITE</u></b>	
<b><u>THYROÏDIENNE ET GASTRIQUE</u></b>	p 79
<b>IV.1- Autoimmunité thyroïdienne : comparaison du dosage des anticorps anti-TPO et anti-Tg</b>	p 79
<b>IV.1.1- Techniques de dosage du DxI®</b>	p 79
<b>IV.1.1.1- Anticorps anti-TPO</b>	p 79
<b>IV.1.1.2- Anticorps anti-Tg</b>	p 79
<b>V.1.2- Techniques radioimmunologiques de routine du laboratoire</b>	p 80
<b>IV.1.2.1- Anticorps anti-TPO</b>	p 80
<b>IV.1.2.2- Anticorps anti-Tg</b>	p 80
<b>IV.1.3- Résultats</b>	p 81
<b>IV.1.3.1- Comparaison anti-TPO DxI®/ anti-TPO RIA</b>	p 81
<b>IV.1.3.2- Comparaison anti-Tg DxI®/ anti-Tg RIA</b>	p 81
<b>IV.1.3.3- Test de répétabilité</b>	p 82
<b>IV.1.4- Discussion</b>	p 82
<b>IV.2- Autoimmunité gastrique : comparaison de 4 techniques de dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque</b>	p 84
<b>IV.2.1- Matériel</b>	p 84
<b>IV.2.2- Méthodes de dosage</b>	p 84
<b>IV.2.2.1- Méthode de dosage des anticorps anti-FI sur le DxI®</b>	p 84
<b>IV.2.2.2- Autres méthodes de dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque : techniques ELISA.</b>	p 85
<b>IV.2.3- Résultats</b>	p 86
<b>IV.2.4- Discussion</b>	p 88
<b>V- <u>ETUDE CLINICOBIOLOGIQUE</u></b>	p 91
<b>V.1- Objectifs</b>	p 91
<b>V.2- Patients et méthode</b>	p 91
<b>V.3- Résultats</b>	p 92
<b>V.4- Discussion</b>	p 95
<b>DISCUSSION - CONCLUSION</b>	p 97



## **INTRODUCTION**



Les maladies autoimmunes thyroïdiennes constituent les pathologies endocriniennes les plus fréquentes dans la population générale. Leur diagnostic repose sur des signes cliniques, des données biologiques et des données d'imagerie. L'élément central de l'exploration biologique de la fonction thyroïdienne est, selon les recommandations de l'ANAES, le dosage de l'hormone thyroïdienne stimulante (TSH) qui permet de confirmer et de typer la dysthyroïdie. Le dosage des anticorps anti-thyroïdiens précise l'étiologie autoimmune de la pathologie, quant au dosage des hormones libres même s'il ne présente pas un intérêt diagnostique majeur il s'avère utile pour le suivi thérapeutique de ces pathologies. Ces dosages hormonaux reposant historiquement sur des techniques radioimmunologiques, considérées comme méthode de référence, ont été adaptés à des techniques froides sur des automates multiparamétriques de plus en plus performants parmi lesquels l'UniCel DxI 800® (DxI®), automate de chimiluminescence. Dans le cadre de l'évaluation analytique de cet automate, mis à la disposition du laboratoire par la société Beckman Coulter, il nous a semblé intéressant de comparer les résultats des dosages des différents paramètres du bilan thyroïdien obtenus avec le DxI® à ceux obtenus avec les techniques radioimmunologiques du laboratoire.

Les maladies thyroïdiennes autoimmunes sont fréquemment associées à d'autres pathologies autoimmunes spécifiques d'organes comme la maladie de Biermer. Le diagnostic de la maladie de Biermer repose sur un faisceau d'arguments clinicobiologiques. Au plan biologique le dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque, a pris une importance considérable depuis la disparition du test de Schilling. Ce dosage a été récemment mis au point sur le DxI®. Après avoir comparé les résultats du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque sur le DxI® à 3 techniques ELISA, nous l'avons utilisé comme outil de dépistage de la maladie de Biermer chez des patients porteurs de pathologies thyroïdiennes autoimmunes au sein d'une étude clinicobiologique rétrospective afin d'apprécier l'association dysimmunité thyroïdienne-dysimmunité gastrique.





## **CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**



# **I- LA DYSIMMUNITE THYROÏDIENNE**

## **I.1- L'exploration biologique de la fonction thyroïdienne**

L'évaluation de la fonction thyroïdienne repose sur des données fournies par la clinique, le bilan biologique et l'imagerie. Depuis plusieurs dizaines d'années, l'exploration biologique de la fonction thyroïdienne a connu de véritables changements.

Elle se limitait dans les années 1960 au PBI (*protein bound iodine*) qui reflétait de manière imparfaite la concentration sérique de la thyroxine (T4). L'introduction de la radioimmunologie au début des années 1970, a bouleversé l'exploration thyroïdienne avec l'introduction des dosages sériques de l'hormone thyroïdienne (TSH), puis de la thyroxine (T4) et de la triiodothyronine (T3) totales, et enfin de la fraction libre de la T4 (T4l) et de la T3 (T3l). Plus récemment, des méthodes immunométriques non isotopiques ont permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité des dosages (1).

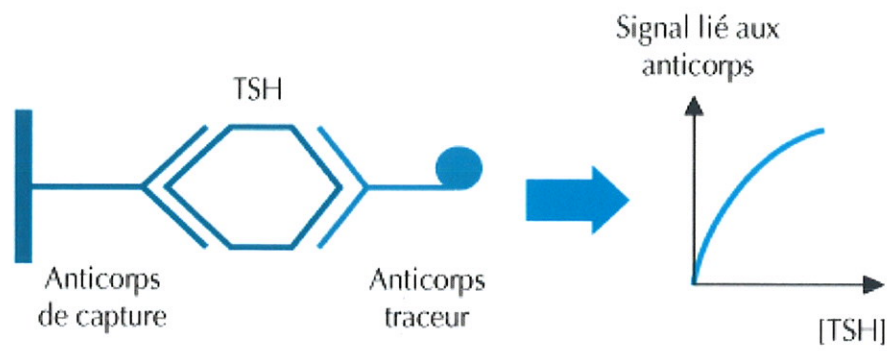
### **I.1.1- Le bilan thyroïdien**

#### **I.1.1.1- Dosage de la TSH**

##### *a- Méthode de dosage*

L'hormone thyroïdienne est produite par les cellules thyroïdiennes de l'antéhypophyse. La TSH est considérée comme l'outil le plus utile pour le diagnostic des anomalies de la fonction thyroïdienne car son taux est le meilleur reflet de l'effet biologique des hormones thyroïdiennes. Les cellules thyroïdiennes hypophysaires sont très sensibles à la moindre variation de l'hormonémie. En effet, la TSH est corrélée à la thyroxine selon une courbe exponentielle. Une réduction de moitié de la T4 multiplie par un facteur de 100 le taux de TSH et inversement (2).

Les premiers essais de dosage de la TSH étaient effectués par des méthodes biologiques dès 1932. Après purification de la TSH et la fabrication des anticorps polyclonaux anti-TSH, les dosages radioimmunologiques devinrent disponibles à partir de 1965. L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre la TSH en 1982 permit le développement des dosages immunométriques et leur utilisation en routine dès 1985 (3). Ces dosages sont tous effectués selon la même configuration : la TSH est prise en « sandwich » entre un anticorps monoclonal en excès fixé à une phase solide (paroi du tube, billes magnétiques...), et un anticorps monoclonal marqué par le traceur. Ils diffèrent en fonction du type de marqueur utilisé et



**Figure 1** : Dosage immunométrique à deux sites ( sandwich ) de la TSH (5).

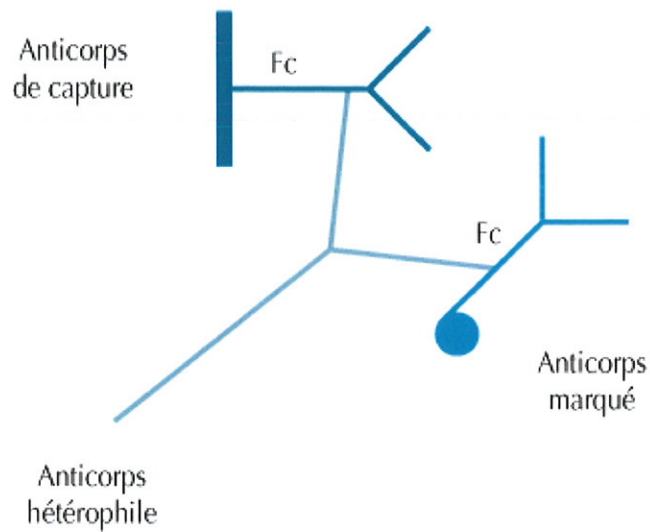
donc de la nature du signal mesuré. L'intensité du signal mesurée est proportionnelle à la concentration de TSH (*Figure 1*). Les premiers dosages immunométriques de la TSH utilisaient un marqueur radioisotopique ( $^{125}\text{I}$  : dosages immunoradiométriques (IRMA)). Compte tenu des contraintes que cela imposait (protection contre les rayonnements ionisants, génération de déchets radioactifs, péremption rapide de certains traceurs à demi-vie courte), les immunodosages avec marqueurs non isotopiques se sont développés : enzyme (peroxydase : dosage immunoenzymométrique), fluorophore (europium : dosage immunofluorimétrique) ou molécule chimiluminescente (ester d'acridinium : dosage immunochimiluminométrique) (3). Ces immunodosages non isotopiques sont tout aussi performants et sont actuellement les plus utilisés d'autant plus qu'ils sont adaptés à l'automatisation.

L'amélioration de la qualité des anticorps et de la détection a fait apparaître des générations successives de dosage. Pour définir les performances des différentes techniques de dosage, le terme de sensibilité fonctionnelle a été introduit. La sensibilité fonctionnelle (SF) correspond à la plus petite valeur de TSH détectable de façon répétée avec un coefficient de variation inter essais inférieur ou égal à 20%.

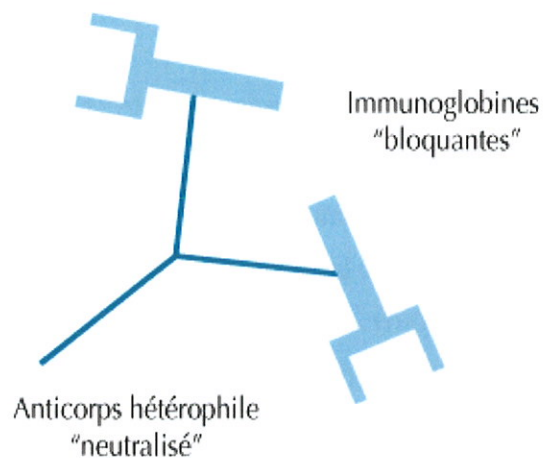
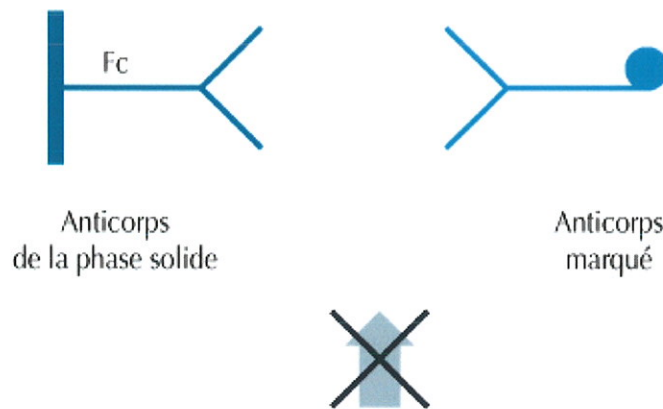
Les premiers immunodosages appelés dosages de *première génération* avaient une sensibilité fonctionnelle de l'ordre de 1 à 2 mUI/l. Ils ne permettaient pas de mettre en évidence une baisse de la concentration de la TSH en dessous des valeurs normales. Ces anciens dosages ne sont plus commercialisés en France (4). En 1985, apparaissent les dosages immunométriques de *deuxième génération* dits « ultrasensibles » avec une sensibilité fonctionnelle de l'ordre de 0,1 à 0,2 mUI/l. Ils permettent d'objectiver la baisse de la TSH sérique observée dans l'hyperthyroïdie.

Ensuite ont été développés les dosages de *troisième génération* avec une sensibilité fonctionnelle de 0,01 à 0,02 mUI/l. Ces dosages permettent aussi une grande discrimination dans les valeurs basses et permettent d'affiner le diagnostic (3). Avec cette sensibilité, il est ainsi possible de mieux quantifier les états de thyrotoxicose en distinguant les hyperthyroïdies sévères à TSH inférieure à 0,01 mUI/l, des hyperthyroïdies frustes ou subcliniques dont la TSH reste comprise entre 0,01 et 0,1 mUI/l. Encore plus récemment est apparu un dosage de *quatrième génération*.

Les dosages actuellement utilisés en routine sont ceux de 2<sup>ème</sup> génération (méthodes immunoradiométriques) et de 3<sup>ème</sup> génération (méthodes immunochimiluminométriques).



**A**



**B**

**Figure 2 :** A- Mécanisme d'interférence des anticorps hétérophiles dans le dosage de la TSH (5).

B- Neutralisation des anticorps hétérophiles par des immunoglobulines non immunes de même espèce animale que les anticorps du réactif (5).

### *b- Causes d'erreur, artéfacts analytiques*

Le dosage de la TSH fait partie des immunodosages les mieux standardisés. Cependant certaines interférences doivent être connues et fortement suspectées devant toute discordance entre le dosage de la TSH et celui des hormones thyroïdiennes libres ou si après vérification par une seconde méthode le résultat montre une variation de 50% par rapport à la première évaluation (2).

- *Les anticorps hétérophiles et facteurs rhumatoïdes (FR)*

Les anticorps hétérophiles sont des anticorps humains endogènes capables de se lier aux immunoglobulines de différentes espèces animales, telles que celles utilisées comme réactif dans les immunodosages. Ils sont capables de lier simultanément les deux anticorps du réactif et donc d'augmenter le signal mesuré entraînant une surestimation de la concentration de TSH (**Figure 2A**). Les anticorps hétérophiles sont des anticorps IgG ou IgM, polyspécifiques c'est-à-dire capables de lier les immunoglobulines de plusieurs espèces de mammifères utilisées comme réactif. Ils sont en général de faible affinité. Ils sont le plus souvent dirigés contre le fragment Fc des immunoglobulines mais des cas d'anticorps hétérophiles dirigés contre le fragment variable Fab ont aussi été décrits (5).

Les plus connus des anticorps hétérophiles, sont les HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) qui peuvent réagir avec les anticorps monoclonaux du réactif, produits chez la souris. Il est important de souligner que ces anticorps anti-immunoglobulines peuvent être présents chez des sujets sains avec une fréquence atteignant 40% (5). Ils s'observent également chez des patients atteints de pathologies autoimmunes.

Ils apparaissent après l'injection d'anticorps monoclonaux à visée diagnostique ou thérapeutique, après un vaccin produit chez l'animal, ou des contacts environnementaux (fermiers, vétérinaires..).

Les facteurs rhumatoïdes (FR) peuvent également perturber le dosage de la TSH en se comportant comme des anticorps hétérophiles, et conduire à des artéfacts par excès dans le dosage de la TSH. On les retrouve chez 70% des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, dans différentes pathologies autoimmunes, chez les sujets atteints de pathologies infectieuses chroniques et aussi chez des sujets sains (le plus souvent des personnes âgées) (5).





Cette interférence sera soupçonnée devant un résultat de TSH élevé (ou non freiné) par rapport aux dosages des hormones libres, ou devant un résultat discordant entre deux techniques puisque l'interférence dépend étroitement du couple d'anticorps utilisé dans le dosage.

Au laboratoire, plusieurs méthodes permettent de mettre en évidence ces anticorps :

- un simple test de dilution est très utile, car l'interférence se manifeste à une concentration optimale : dès qu'on dilue on casse l'interférence. Un test de dilution incohérent permettra d'affirmer que ce n'était pas la TSH qui était dosée ;

- une neutralisation de l'anticorps perturbateur par des méthodes physico-chimiques (prétraitement par le polyéthylène glycol (PEG)) ou immunologiques (prétraitement du sérum par des immunoglobulines non immunes ou du sérum de même espèce animale que les anticorps du dosage).

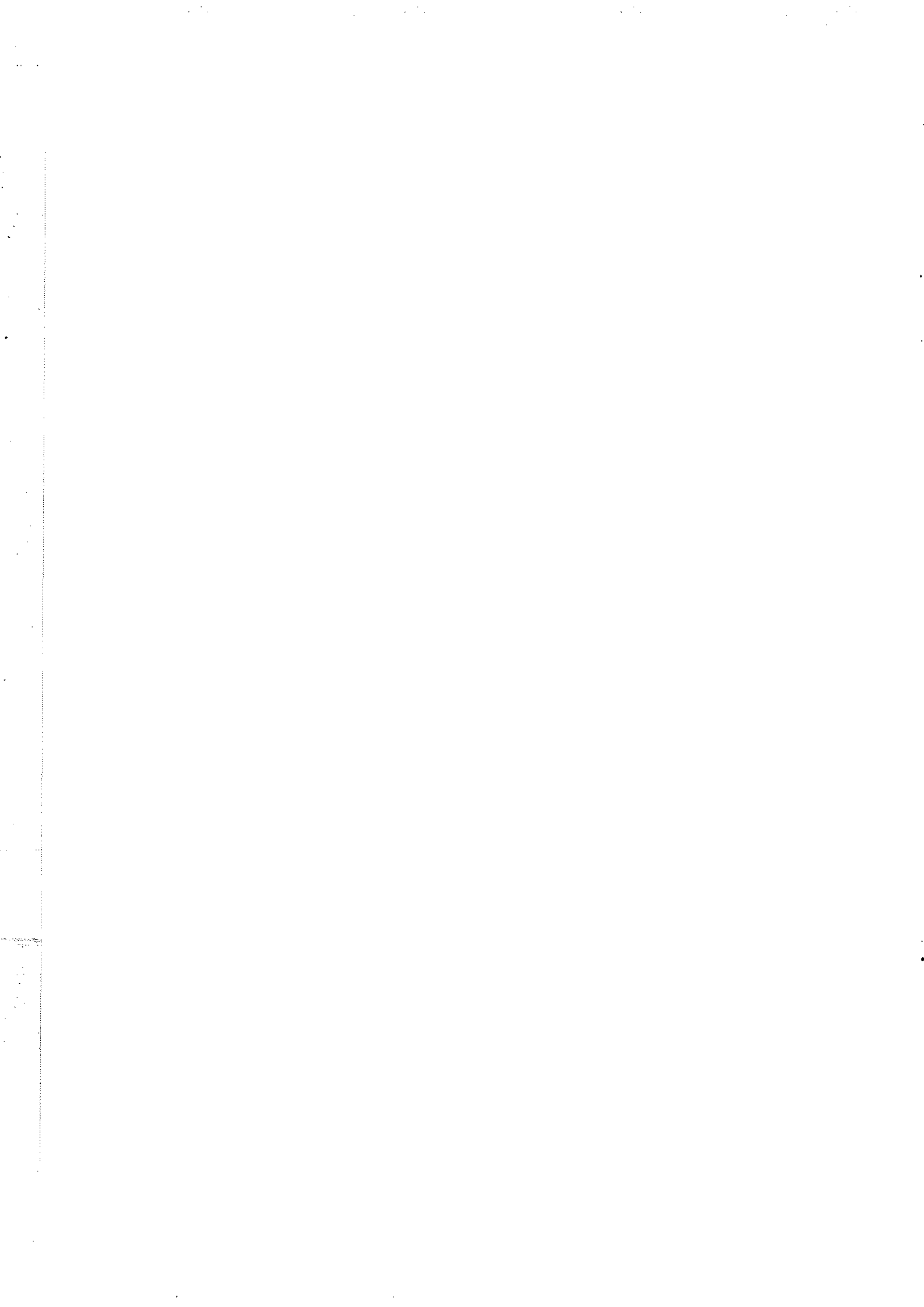
A ce jour toutes les trousse de dosage contiennent des immunoglobulines « bloquantes » non spécifiques (*Figure 2B*) mais elles ne sont pas toujours en quantité suffisante. Il existe maintenant des tubes spéciaux pour bloquer les anticorps hétérophiles : tubes HBT (laboratoire Scantibodies) (2).

- *Les anticorps anti-TSH*

Les anticorps anti-TSH sont une autre source d'artéfact du dosage de la TSH beaucoup plus rare : 8 cas sur une série de 2500 maladies de Basedow ont été rapportés (4). Ces anticorps reconnaîtraient en fait plus souvent la TSH bovine ou porcine que la TSH humaine. On dénombre aussi quelques cas d'anticorps anti-TSH humaine chez des patients euthyroïdiens. Le mécanisme de ces anticorps reste inconnu. Au cours du dosage, la TSH complexée à l'anticorps sera plus ou moins reconnue par les anticorps de dosage (5).

- *Spécificité*

Les premières techniques sandwich ont donné au premier trimestre de la grossesse des résultats erronés. Le dosage de la TSH ne pose plus aujourd'hui de problème de réactions croisées avec l'hormone choriogonadotrophique et les gonadotrophines. Le problème de la spécificité concerne la reconnaissance des différentes isoformes par les dosages actuels, incapables de différencier spécifiquement les isoformes biologiquement actives puisque l'ensemble des isoformes est dosé (5).



- *Défaut de séparation des complexes sandwich*

Les méthodes utilisant le couple avidine-biotine (ou streptavidine-biotine) comme technique de séparation donneront des résultats faussement bas en cas de traitement par la biotine, qui empêchera la séparation complète. De la même façon, des anticorps anti-avidine peuvent théoriquement gêner cette séparation, mais aucune erreur par défaut n'a encore été signalée dans cette situation (5).

- *Interférence du complément*

La liaison de la TSH à certains anticorps de capture peut être inhibée par le complément C1q, se traduisant par une baisse de la concentration apparente de TSH sur le sérum frais. Cette interférence sera supprimée par la dilution, par le vieillissement du sérum (le complément étant très labile), ou par un prélèvement sur EDTA, si la technique le permet (5).

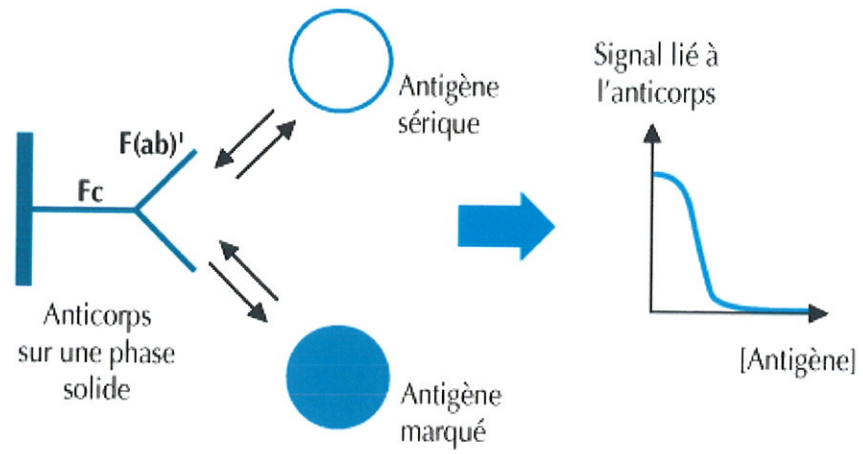
- *L'effet crochet ou « Hook-effect »*

Ce phénomène, propre aux techniques « sandwich », n'apparaît que pour des concentrations très élevées en antigène. Lorsqu'il y a un vrai excès d'antigène, tout se passe comme si l'antigène était monovalent, ne se fixant qu'à un seul des deux anticorps. Les résultats sont rendus par défaut. Ce phénomène ne concerne que très rarement le dosage de la TSH, en effet il est décrit pour des concentrations très supérieures à 1000 mUI/l, exceptionnellement rencontrées dans l'hypothyroïdie primaire. Cet effet crochet concerne les dosages de molécules avec une très grande marge de variation physiopathologique (prolactine et marqueurs tumoraux).

### **I.1.1.2- Dosage des hormones libres**

La tétraiodothyronine ou thyroxine (T4) constitue 80% de la production hormonale, le reste étant constitué par la triiodothyronine (T3). La majorité de la T3 circulante provient de la désiodation de la T4 au niveau périphérique sous l'effet d'enzymes 5' désiodases (présentes au niveau du foie, rein, muscle, cerveau). De ce fait, bien qu'elle soit l'hormone thyroïdienne biologiquement active, la T3 plasmatique est un reflet de la fonction thyroïdienne moins fidèle que la T4. La T3 et la T4 exercent au niveau hypophysaire et hypothalamique un rétrocontrôle négatif sur leur propre sécrétion (6).

La T4 et la T3, circulent dans le sang sous deux formes en équilibre : l'une libre et l'autre liée à des protéines de transport représentées pour la majeure partie par la Thyroxine Binding Globuline (TBG), la préalbumine (PA) ou transthyrétine, et l'albumine dans une moindre



**Figure 3 :** Dosage par compétition des hormones thyroïdiennes (5).

proportion. Chez un sujet euthyroïdien, seulement 0,02% de la T4 est libre et 0,3% de la T3 (6). Il est généralement admis que seule la fraction libre traverse la membrane capillaire et atteint les cellules cibles. Le dosage des hormones libres est donc primordial. Mais il est délicat pour plusieurs raisons (7) :

- la proportion très faible de cette fraction libre (concentration en picomoles) ;
- l'équilibre entre la fraction libre et la fraction liée au cours du dosage ne doit pas être modifié ;
- l'activité des composants est très dépendante des facteurs physicochimiques risquant d'être modifiés au cours de la réaction (température, pH, force ionique).

#### *a- Les différentes méthodes de dosage*

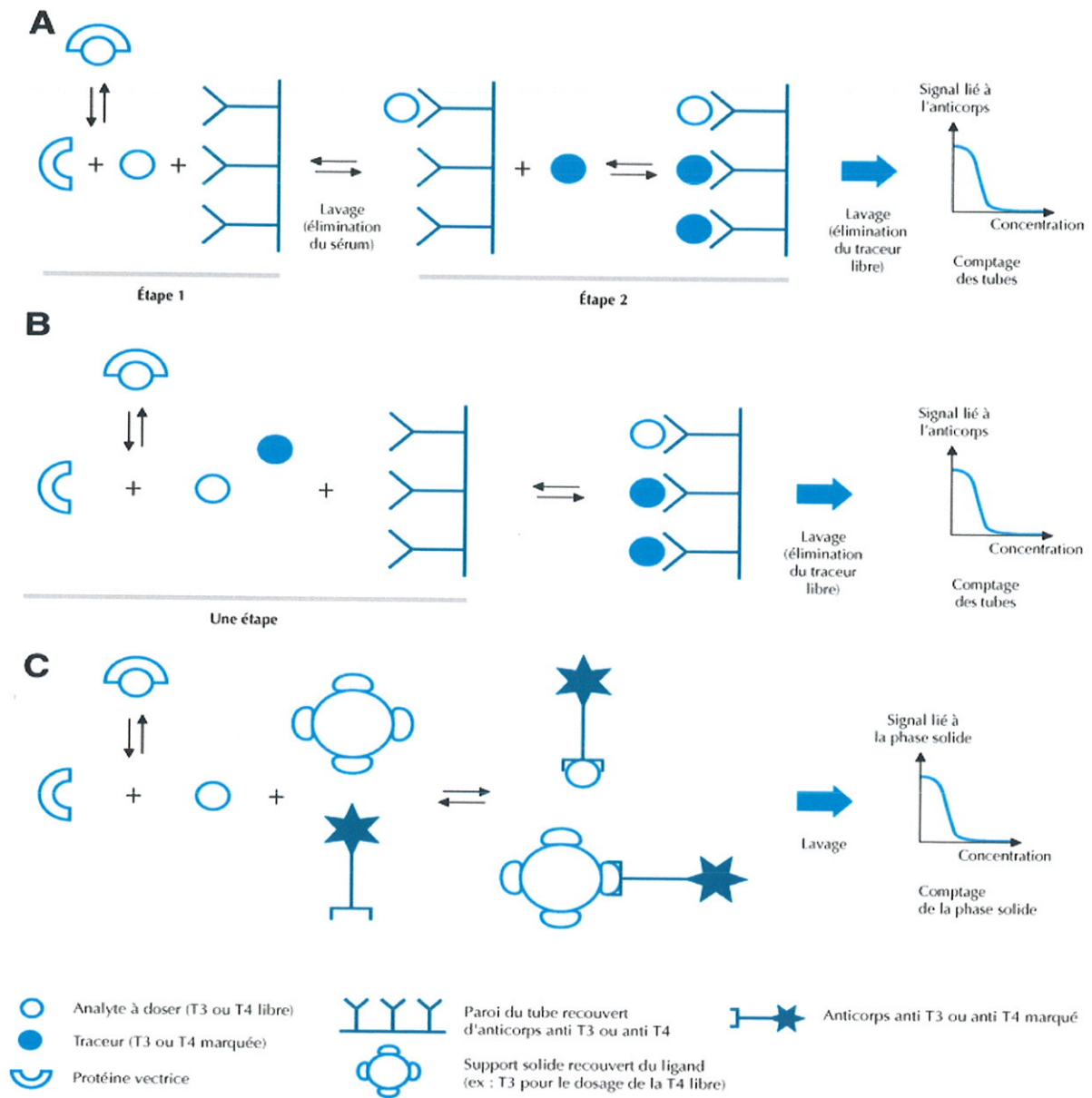
Pour les raisons citées ci-dessus, le dosage direct des hormones libres est impossible, une étape d'extraction est préalablement nécessaire. Une fois les hormones libres extraites elles sont dosées par compétition en raison de leur petite taille. Le sérum à étudier est incubé avec un anticorps anti-hormone et un traceur ou analogue portant le signal (isotopique, enzymatique, luminescent). L'anticorps et le traceur sont ajoutés en quantité limitée. Le traceur et l'hormone à doser entrent en compétition pour les sites de l'anticorps. Le signal obtenu est inversement proportionnel à la concentration d'antigène présente dans le milieu (*Figure 3*).

On distingue différentes méthodes selon le type d'extraction des hormones libres.

- Méthodes avec extraction physicochimique : méthodes absolues de référence (5)

Ces méthodes nécessitent une séparation physique de l'hormone libre et de l'hormone liée. Cette séparation se fait par dialyse à l'équilibre ou par ultrafiltration. Dans le dialysat ou l'ultrafiltrat, la T4I ou la T3I est dosée directement par une méthode radioimmunologique très sensible. Elles sont méthodes de référence car ni l'anticorps, ni le traceur ne sont jamais en contact avec la fraction liée. A l'heure actuelle, un seul dosage de la T4I par dialyse/RIA est commercialisé.

Les méthodes utilisant la chromatographie sur séphadex pour séparer les fractions libres et liées sont quelquefois classées parmi ces méthodes. Malheureusement, les techniques physiques seules capables de séparer avec précision la fraction libre de la fraction liée, sont exigeantes, difficiles à utiliser et d'un coût élevé pour un usage de routine. Ces méthodes sont en principe uniquement disponibles dans des laboratoires de référence. En routine les dosages utilisés ne produisent qu'une estimation des hormones libres (8).



**Figure 4 :** A : Méthode de dosage des hormones libres en deux étapes. Un lavage effectué entre les deux étapes évite tout contact entre les protéines vectrices du sérum et le traceur (5).

B : Méthode de dosage des hormones libres en une étape avec traceur conjugué. Le contact entre le sérum et le traceur rend le dosage beaucoup plus sensible aux fluctuations des protéines vectrices (5).

C : Méthode de dosage des hormones libres avec un anticorps marqué (SPALT). La phase solide est recouverte d'un ligand proche de l'hormone à doser qui va entrer en compétition avec l'hormone libre (5).

- Méthodes avec immuno-extraction

Ces méthodes sont les plus utilisées en pratique. Elles peuvent comporter une ou deux étapes.

- Méthodes en deux étapes

L'hormone libre, dans un premier temps est extraite du sérum par un anticorps, et la fraction liée est éliminée par lavage. La deuxième étape met en contact le traceur avec les sites anticorps restés libres (9). L'avantage de cette méthode est que le traceur n'est jamais en contact avec les protéines vectrices (**Figure 4A**). En méthode manuelle elle reste délicate et son développement actuel est lié à son automatisation (Ex : Imx Abbott®).

- Méthodes en une étape

Dans les méthodes en une étape, tous les composants du dosage sont ajoutés en même temps (**Figure 4B**). Le traceur est une hormone modifiée de telle sorte que son immunoréactivité vis-à-vis de l'anticorps soit conservée et que l'affinité pour les protéines de liaison, soit si possible totalement perdue.

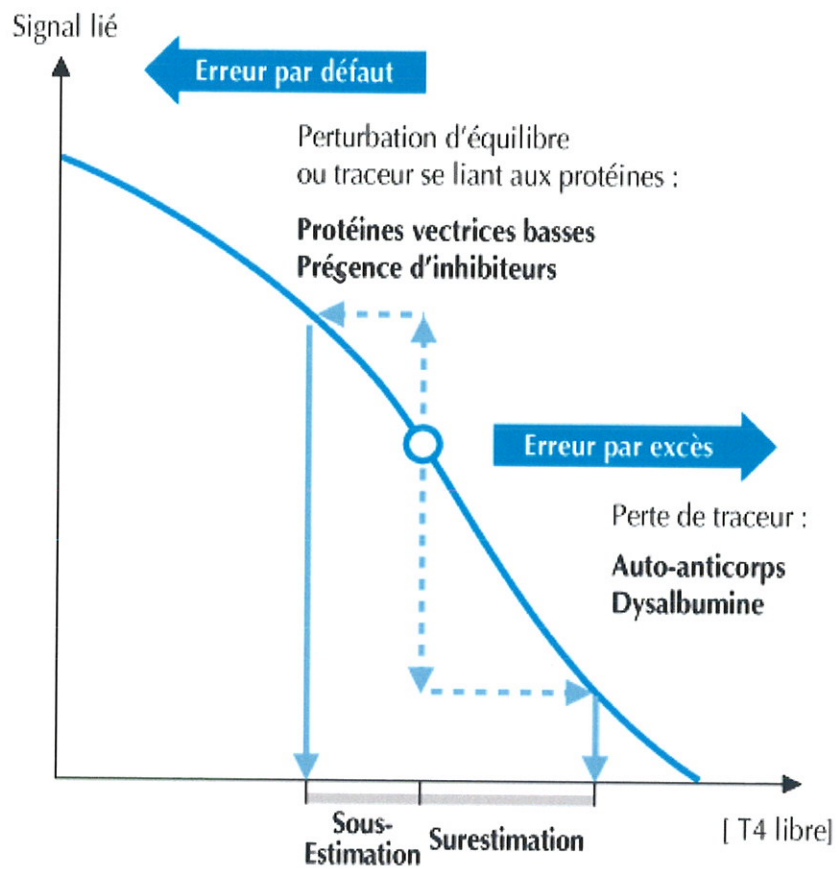
Il peut s'agir :

- d'une hormone analogue (molécule de T4 modifiée) marquée à l'iode 125 ;
- d'une hormone conjuguée à une macromolécule (enzyme par exemple), l'encombrement stérique du complexe T4-macromolécule empêche la liaison aux protéines de transport (Ex : Enzymum test®) ;
- d'une hormone dérivée (T4 biotinylée) (Ex : Immulite®).

- Méthodes avec anticorps marqué

Les méthodes en une étape les plus récentes sont des méthodes où le signal est porté par l'anticorps, souvent appelées SPALT (solid phase antigen linked technique). La compétition pour les sites anticorps est réalisée entre l'hormone libre et un ligand fixé sur un support solide. Ce ligand est une molécule voisine de l'hormone à doser : par exemple la T3 pour la T4. Ce ligand est immobilisé sur un support solide au moyen d'une grosse molécule qui par encombrement stérique doit l'empêcher de se fixer aux protéines vectrices avec lesquelles il sera en contact (**Figure 4C**).

Ces méthodes en une étape avec anticorps marqué tendent aujourd'hui à se généraliser en raison de bonnes qualités analytiques (Ex : Vitros®, Bérilu®, Elecsys®, Immunotech RIA®).



**Figure 5 :** Mécanisme des interférences liées aux protéines vectrices dans le dosage des hormones libres en une étape (5).



Le dosage des hormones thyroïdiennes libres reste techniquement délicat, et tout composé présent dans le sérum capable de lier le traceur ou l'anticorps va modifier de façon significative l'équilibre de compétition et artéfacter le dosage.

#### *b- Interférences analytiques*

- *Les anticorps anti-hormones thyroïdiennes*

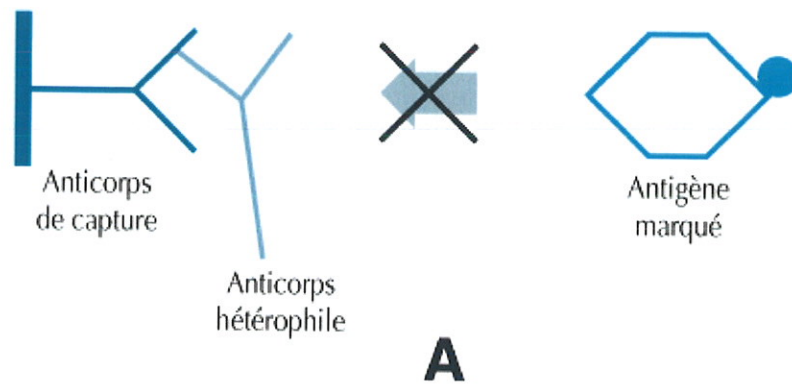
Il s'agit d'anticorps endogènes capables de lier la thyroxine et/ou la triiodothyronine : dans près de la moitié des cas il s'agit d'anticorps anti-T3, dans un quart des cas d'anticorps anti-T4, et dans un quart des cas on retrouve les deux spécificités (5). Dans 2/3 des cas ces autoanticorps coexistent avec des anticorps anti-thyroglobuline beaucoup plus souvent qu'avec des anticorps anti-thyropéroxydase. La prévalence dans la population générale est faible de l'ordre de 0,1% (5). Elle semble augmenter chez les patients atteints de maladies autoimmunes (9).

Le problème majeur posé par ces anticorps est celui de l'interférence dans le dosage des hormones thyroïdiennes effectué en une étape. Le traceur (T3 ou T4 portant le signal) sera piégé par l'autoanticorps et ne sera plus disponible pour la réaction par compétition. Les concentrations en T4I et T3I mesurées seront alors faussement élevées (*Figure 5*). Les techniques les plus sensibles à cette interférence étaient les techniques utilisant un traceur analogue. Les techniques avec anticorps marqué (SPALT), sont diversement sensibles en fonction de la nature du ligand et de l'anticorps présent dans le sérum à doser. Si l'autoanticorps reconnaît le ligand fixé sur la phase solide il peut y avoir interférence et élévation artificielle de l'hormonémie.

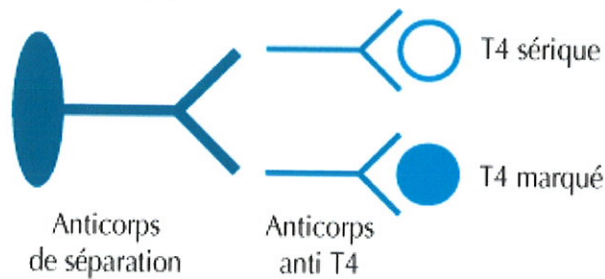
Les techniques en deux étapes, évitant le contact entre les protéines plasmatiques et le traceur, ne sont pas sensibles à la présence de ces autoanticorps et peuvent donc être utilisées si l'on suspecte leur présence.

- *Les anticorps hétérophiles et facteurs rhumatoïdes (4-6)*

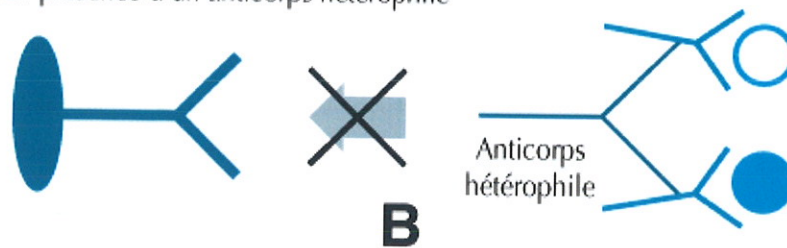
Les anticorps hétérophiles peuvent produire des artéfacts dans le dosage par compétition des hormones libres mais avec une fréquence très faible : l'anticorps hétérophile (ou le facteur rhumatoïde) peut gêner la liaison de l'antigène à l'anticorps par encombrement stérique mais pour cela il doit être dirigé contre le fragment Fab, ce qui n'est pas le cas le plus fréquent (*Figure 6A*). De plus la faible affinité de l'anticorps hétérophile ne lui permet pas de s'opposer à la liaison de l'anticorps du dosage avec la T4 dans la majorité des cas.



a) En l'absence d'interférence



a) En présence d'un anticorps hétérophile



**Figure 6 :** **A : Interférence des anticorps hétérophiles ou des facteurs rhumatoïdes dans le dosage des hormones libres :** l'encombrement stérique généré par la fixation des immunoglobulines (facteurs rhumatoïdes, anticorps hétérophiles) sur les anticorps de la phase solide empêche la fixation du traceur (5).

**B : Interférence des anticorps hétérophiles lors d'un dosage par compétition avec séparation par un deuxième anticorps :** l'anticorps hétérophile se fixe sur le fragment Fc des anticorps anti-T4 (ou T3), empêchant la reconnaissance de ces derniers par le deuxième anticorps fixé sur un support solide. L'élimination des complexes antigènes-anticorps au cours du lavage va entraîner une diminution du signal d'où une surestimation de la concentration en T4I (5).

- *Défaut de séparation des complexes antigènes-anticorps (5, 6, 10)*

Dans le principe de compétition tout comme dans le principe sandwich, la séparation des complexes antigènes-anticorps peut se faire par l'intermédiaire de l'anticorps réactif fixé sur un support solide ou phase solide (paroi interne des tubes), d'un deuxième anticorps dirigé contre le premier, ou du couple avidine-biotine (support solide recouvert de streptavidine, liant des anticorps biotinylés).

Un anticorps hétérophile peut empêcher la liaison du deuxième anticorps, conduisant de même à une erreur par excès (*Figure 6B*).

Des anticorps anti-avidine sont capables d'empêcher la séparation pour les méthodes utilisant le couple avidine-biotine, ce qui se traduira par de fausses élévations. Un traitement par la biotine entraînera le même artéfact.

Avec les méthodes SPALT, est apparue une nouvelle sorte d'interférence. En effet, le patient peut avoir des anticorps dirigés contre la molécule qui permet le couplage du ligand à la phase solide, ce sont les anticorps anti-phase solide. En se fixant sur la phase solide, ils empêchent par encombrement stérique la liaison de l'anticorps marqué au ligand, entraînant une erreur par excès par perte du traceur.

- *Réactions croisées*

L'interférence de l'acide tri-iodothyroacétique (Triac) dans le dosage de la T3I est fréquente et peut constituer un piège dans la mesure où cette prise médicamenteuse n'est pas toujours connue du médecin. La réaction croisée de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (Voltarène®, Tilcotil®) avec le dosage de la T3I a été décrite (5, 6).

- *Anomalies des protéines de transport*

Selon Nelson (11), les dosages de la T4I dépendent en fait de la fraction liée. En effet lors de la perturbation de l'équilibre due au dosage (dilution du sérum dans le milieu réactionnel, ajout d'un anticorps très affiné), la fraction liée stabilise la concentration de T4I par dissociation de l'hormone de la protéine vectrice. Une variation quantitative ou qualitative des protéines de transport peut donc influencer sur le dosage.

➤ *Anomalies quantitatives*

Pour des modifications modérées des protéines vectrices, comme au cours de la grossesse, les différentes méthodes actuelles donneront des résultats approximativement valides. En revanche les patients présentant des maladies graves non thyroïdiennes, ont souvent des



concentrations basses d'albumine, de préalbumine et de TBG. Cela se traduira par des concentrations faussement abaissées de T4I pour beaucoup de méthodes : la fraction liée (qui est faible) ne pourra rétablir un équilibre trop perturbé par des conditions de dosage inadéquat (*Figure 5*).

La méthode de dialyse à l'équilibre est la moins dépendante de la fraction liée mais peut être néanmoins perturbée. Les méthodes en deux étapes sont réputées ne pas être influencées par les concentrations basses d'albumine, de préalbumine et de TBG.

#### ➤ Anomalies qualitatives

Les anomalies qualitatives des protéines de transport peuvent concerner la TBG ou la transthyrétine, mais en France c'est l'albumine la plus fréquemment en cause. La dysalbuminémie familiale hyperthyroxinémique (FDH) se caractérise par la présence dans le sérum d'une forme particulière d'albumine avec une affinité très élevée pour la thyroxine (6). Cela affecte les dosages en une étape. Le problème analytique est comparable à celui des anticorps anti-T4 décrit précédemment, avec perte du traceur et résultat faussement élevé (*Figure 5*).

Les techniques en une étape avec analogue marqué étaient le plus souvent artéfactées, les autres méthodes en une étape comme les méthodes SPALT peuvent également quoique plus rarement, donner un résultat trop élevé. La dialyse à l'équilibre et les méthodes en deux étapes n'y sont pas sensibles à condition que le traceur ne soit jamais en contact avec le variant protéique d'affinité anormale pour l'hormone (5).

#### • Influence des inhibiteurs de liaison

Des inhibiteurs de liaison (ou compétiteurs) peuvent entrer en compétition avec les hormones thyroïdiennes pour la liaison aux protéines de transport et être responsables de grandes discordances entre les techniques. Les inhibiteurs de liaison les mieux connus sont les acides gras non estérifiés, libérés sous l'influence de la lipoprotéine lipase activée par l'héparine. Ils sont capables de déplacer la T4 de sa liaison à l'albumine, une élévation transitoire de la fraction libre sera donc enregistrée (12). Cette élévation fugace dépendra beaucoup de la méthode, car la dilution dans le milieu réactionnel va affaiblir l'effet de ces inhibiteurs de faible affinité, de façon variable d'une technique à l'autre (5). En pratique, afin de minimiser l'effet de l'héparine, le prélèvement devra être effectué au minimum 10 heures avant l'injection (6).

Paramètres concernés	Erreur	Techniques utilisées	Cause de l'artéfact
<i>TSH</i>	Excès	Toutes techniques	Anticorps hétérophiles
	Excès	Toutes techniques	Facteurs rhumatoïdes
	Excès	Toutes techniques	Autoanticorps anti-TSH
	Défaut	Séparation avidine-biotine	Traitement par la biotine
	Défaut	Avec certains anticorps	Complément
	Défaut	Toutes techniques	Effet crochet
<i>Hormones libres</i>	Excès	Méthode une étape	Dysalbuminémie
	Excès	Méthode une étape	Autoanticorps anti-hormone
	Excès	Méthode SPALT	Anticorps anti-phase solide
	Excès	Toutes techniques	FR et anticorps hétérophiles
	Excès	Séparation 2 <sup>ième</sup> anticorps	FR et anticorps hétérophiles
	Excès	Séparation avidine-biotine	Traitement par la biotine
	Excès	Séparation avidine-biotine	Anticorps anti-avidine
	Défaut	Méthode une étape* Méthode deux étapes*	Protéines vectrices basses, Inhibiteurs de liaison
<i>T3 libre</i>	Excès	Toutes techniques	Réaction croisée du Triac

FR : facteurs rhumatoïdes, \* Si la technique introduit une perturbation trop importante de l'équilibre fraction liée-fraction libre.

**Tableau 1 :** Interférences analytiques portant sur les paramètres du bilan thyroïdien (5).

Dans l'insuffisance rénale, des acides organiques (acide indole acétique, acide hippurique), ont été identifiés comme des inhibiteurs capables de donner des résultats faussement abaissés avec les méthodes analogues et des résultats élevés avec l'équilibre de dialyse (5).

Certains médicaments ont également un pouvoir inhibiteur comme le furosémide, les salicylates et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofénac, fenclofénac) (6).

Les **Tableaux 1 et 2** récapitulent respectivement les interférences analytiques et les problèmes liés aux protéines vectrices que nous venons d'envisager, en fonction de la méthodologie utilisée.

Pour toutes les raisons techniques évoquées, chez les patients hospitalisés atteints de maladies graves non thyroïdiennes et bénéficiant de traitements médicamenteux lourds, la variabilité des résultats de T4I et de T3I reste la plus grande et l'interprétation du résultat devra tenir compte de la méthode utilisée.

### **I.1.1.3- Le bilan immunologique thyroïdien**

Le bilan immunologique thyroïdien est souvent associé au bilan fonctionnel lors de pathologies thyroïdiennes mais on le retrouve aussi prescrit lors de pathologies autoimmunes non thyroïdiennes ou lors de traitements pouvant induire une diminution de la tolérance immune (13). En routine le dosage des anticorps anti-thyropéroxydase (anti-TPO), anti-thyroglobuline (anti-Tg), et anti-récepteur de la TSH (anti-RTSH) sont disponibles. Les techniques utilisées pour le dosage varient en fonction du type d'anticorps.

#### *a- Les différents autoanticorps et intérêts cliniques*

- Les anticorps anti-TPO

La thyropéroxydase (TPO) est la cible principale des anticorps anti-thyroïdiens. C'est une glycoprotéine transmembranaire localisée essentiellement à la surface apicale des thyrocytes au niveau des microsomes. Par son activité enzymatique, la TPO intervient dans différentes étapes de la synthèse des hormones thyroïdiennes : iodination de la thyroglobuline et couplage des iodotyrosines sur celle-ci. Elle se présente sous deux formes produites par épissage alternatif, toutes deux reconnues par les autoanticorps. Ces autoanticorps anti-TPO ne reconnaissent que 2 à 6 épitopes de la thyropéroxydase. Certains épitopes sont d'ailleurs communs à la thyroglobuline expliquant certaines réactions croisées (14).

Les anticorps anti-TPO sont de nature polyclonale, essentiellement de type IgG. Le dosage des anticorps anti-TPO est le test le plus sensible pour le diagnostic d'une maladie

	Dialyse à l'équilibre	Méthodes en 2 étapes	Méthode en 1 étape avec analogue	Méthode en 1 étape avec conjugué
<i>Variants d'albumine ou de transthyréline</i>	N	N	↑↑	↑↑
<i>Autoanticorps anti-hormone</i>	N	N	↑↑	↑
<i>Hypoalbuminémie, baisse des protéines vectrices</i>	N	N ou ↓*	↓↓	N ou ↓*
<i>Acides gras, inhibiteurs de liaison</i>	↑	↑	↓↓	↑

\* Si le dosage introduit une perturbation trop importante de l'équilibre fraction libre-fraction liée, N : normal, ↑ : haut, ↓ : bas

**Tableau 2 :** Impact des interférences liées aux protéines vectrices dans les dosages des hormones libres selon la méthodologie (5).



thyroïdienne autoimmune. L'apparition des anticorps anti-TPO est la première anomalie constatée lors du développement d'une thyroïdite de Hashimoto précédant l'installation de l'hypothyroïdie (15). L'immunisation est en général concomitante pour la thyroperoxydase et la thyroglobuline. Les anticorps anti-TPO sont mis en évidence plus précocement et avec une amplitude plus importante que les anticorps anti-Tg (15). Ces anticorps sont potentiellement cytotoxiques du fait de leur fixation au complément. Ils ont un rôle majeur dans la cytotoxicité dépendante de l'anticorps (16). Cependant, ils ne sont pas directement pathogènes comme le montre l'innocuité de la transmission des anticorps anti-TPO de la mère au fœtus (17).

La question de signification des anticorps anti-TPO, cause ou marqueur de maladies thyroïdiennes autoimmunes reste toujours débattue. Les anticorps anti-TPO tout comme les anticorps anti-Tg constitueraient plus des marqueurs de dysimmunité thyroïdienne ou de susceptibilité. Les anticorps anti-TPO représentent les anticorps anti-thyroïdiens les plus fréquemment présents au cours des pathologies thyroïdiennes autoimmunes. Ils sont détectables dans plus de 98% des thyroïdites de Hashimoto et dans 85% des maladies de Basedow (15). Ils sont également présents chez 6 à 12 % des adultes en bonne santé sans pathologie thyroïdienne apparente, leur prévalence augmentant avec l'âge et chez la femme (15).

Les patientes présentant des taux détectables d'anticorps anti-TPO en début de grossesse présentent un risque important (50%) de développer une thyroïdite du post-partum. De récentes publications ont montré qu'à l'âge de 5 ans, les quotients intellectuels d'enfants nés de mères présentant en début de grossesse une hypothyroïdie modérée seraient inférieurs à ceux d'enfants nés de mères sans pathologie thyroïdienne connue (18). Si ces faits se confirment il est licite de se demander si les dosages de TSH, T4I et des anticorps anti-TPO doivent être recommandés en début de grossesse.

Les anticorps anti-TPO peuvent être prédictifs d'un dysfonctionnement thyroïdien s'ils sont présents lors de traitement par amiodarone, lithium, IL2, INF $\alpha$ , ou GMCSF (stimulant de la granulopoïèse) (15).

Le dosage des anticorps anti-TPO a donc plusieurs intérêts (8) :

- étiologique, constituant des marqueurs sensibles et spécifiques des thyroïdopathies autoimmunes ;
- prédictif d'un dysfonctionnement thyroïdien : en cas de grossesse, de prise de certains médicaments, et quant au passage d'une hypothyroïdie infraclinique à une hypothyroïdie franche et définitive surtout si le dosage des anticorps anti-TPO est associé à celui de la TSH.

<i>Pathologie</i>	<b>Anticorps anti-TPO</b>	<b>Anticorps anti-Tg</b>	<b>Anticorps anti-RTSH</b>
<i>Thyroïdite de Hashimoto</i>	95-100%	85%	0%
<i>Thyroïdite atrophique</i>	75%	50%	30%
<i>Maladie de Basedow</i>	75%	50%	90%
<i>Adultes sains</i>	4 à 8% 15% après 60 ans	4 à 8% 15% après 60 ans	0%

**Tableau 3** : Fréquence de positivité des principaux autoanticorps anti-thyroïdiens (22).

- Les anticorps anti-Tg

La thyroglobuline est une glycoprotéine iodée qui sert de support à la synthèse des hormones thyroïdiennes. Elle est produite par les follicules thyroïdiens et représente le constituant majeur de la colloïde. L'hétérogénéité de la molécule, par le degré d'iodation, par les contenus en glucides et en acide sialique retentit sur son immunoréactivité. La carte épitopique de cette molécule très immunogène est connue : une quarantaine d'épitopes potentiels ont été identifiés, regroupés en 6 domaines (19). Il a été montré que les autoanticorps anti-thyroglobuline retrouvés en faible concentration chez des sujets normaux avaient un répertoire de spécificité très large alors que ceux présents lors de pathologies thyroïdiennes autoimmunes étaient en majorité dirigés contre des domaines particuliers de la molécule (20).

Ces anticorps anti-Tg ont été historiquement les premiers décrits. Cependant le rôle pathogène de ces anticorps polyclonaux n'est pas apparent. Ils ne sont pas cytotoxiques contrairement aux anticorps anti-TPO. Ils peuvent constituer des complexes de masse moléculaire élevée avec la thyroglobuline, circulants ou fixés dans les tissus thyroïdiens. Il a été récemment mis en évidence que le gène de la thyroglobuline pourrait être un gène de susceptibilité majeur dans le développement des thyroïdites autoimmunes (21).

En pratique clinique, les anticorps anti-Tg sont moins informatifs que les anticorps anti-TPO, en raison de leur moindre prévalence dans les thyroïdopathies autoimmunes : 25% dans la maladie de Basedow, 40% dans les thyroïdites lymphocytaires chroniques et 0 à 5% chez les contrôles sains (17, 22) (**Tableau 3**), on les recherchera donc en cas de négativité de ces derniers (15). De plus, ils peuvent être positifs lors de pathologies autoimmunes autres que thyroïdiennes. Leur recherche est essentiellement faite chez les patients traités pour cancers différenciés de la thyroïde pour la validation du dosage de la thyroglobuline (anticorps retrouvés dans 20% des cas) (15). La décroissance des taux d'anticorps anti-Tg après chirurgie et iode radioactif est de bon pronostic. En revanche des taux élevés de ces anticorps signent la persistance d'une stimulation antigénique en relation avec la présence de tissu thyroïdien.

<b><i>Abréviation</i></b>	<b><i>Traduction</i></b>	<b><i>Fonction</i></b>
<b><i>TRAb</i></b>	<i>Thyrotropin receptor antibody</i>	= Ac R-TSH globaux
<b><i>TSAb</i></b>	<i>Thyroid stimulating antibody</i>	= Ac R-TSH stimulants
<b><i>TSI</i></b>	<i>Thyroid stimulating Ig</i>	
<b><i>TSBAb</i></b>	<i>Thyroid stimulation blocking Ab</i>	= Ac R-TSH bloquants
<b><i>TSII</i></b>	<i>Thyroid stimulation inhibitory Ig</i>	

**Tableau 4** : Nomenclature des anticorps anti-RTSH d'après (17).

- Les anticorps anti-RTSH

Le RTSH est une glycoprotéine appartenant à la famille des récepteurs couplés au protéine G et comporte un segment extracellulaire très développé, 7 domaines transmembranaires et un segment intracellulaire. Les épitopes conformationnels décrits couvrent l'ensemble du domaine extracellulaire (partie C terminale). Ce récepteur est exprimé majoritairement sur la face basale des thyrocytes. Il constitue l'interface entre le thyrocyte et l'hormone hypophysaire thyrostimulante régulant la fonction et la croissance des cellules thyroïdiennes. Ces récepteurs se trouvent également au niveau du tissu orbitaire rétrobulbaire et à un moindre degré sur de nombreuses cellules (adipocytes, lymphocytes, cellules du muscle cardiaque).

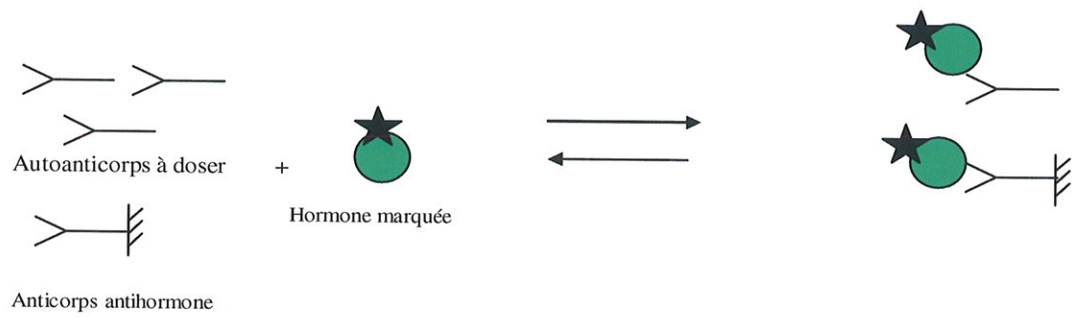
Les anticorps anti-RTSH sont surtout des IgG1 (15). Les anticorps anti-RTSH sont hétérogènes dans leur spécificité épitopique d'où un effet biologique varié. Ces anticorps peuvent soit mimer l'action de la TSH, ils sont alors stimulants (TSAb : Thyroid Stimulating Antibody ou TSI : Thyroid Stimulating Immunoglobulin), soit jouer le rôle d'antagoniste et ils deviennent bloquants (TBAb : Thyroid Blocking Antibody ou TSHI : Thyroid Stimulating Inhibitory Immunoglobulin) (23). La nomenclature des anti-RTSH est précisée dans le **Tableau 4**.

➤ Autoanticorps stimulants :

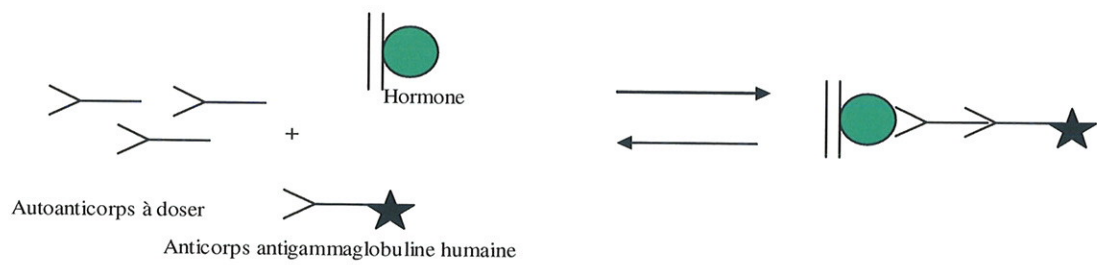
Les autoanticorps stimulants peuvent avoir deux effets. Dans la maladie de Basedow, ils stimulent l'activité de la thyroïde (TSAb : thyroid stimulating antibody) car ils ont le même effet que la TSH mais plus prolongé d'où le nom historique lié à la découverte de LATS (long acting thyroid stimulator). Ainsi, ils provoquent une hypersécrétion de hormones thyroïdiennes en augmentant la captation de l'iode par les thyrocytes et en accentuant l'iodation de la thyroglobuline. Il n'y a pas de corrélation étroite entre l'intensité de l'hyperthyroïdie et le titre des anticorps anti-RTSH.

L'activité stimulante peut aussi s'exercer au niveau de la croissance cellulaire qui conduit à la formation d'un goitre (TGIB : thyroid growth immunoglobulin).

La prévalence de ces anticorps stimulants dépend de la technique utilisée. Ces anticorps sont détectés chez plus de 90% des patients basedowiens avant tout traitement (17). Cette haute prévalence est en faveur de la responsabilité de ces anticorps dans la maladie de Basedow. La pathogénécité de ces anticorps est également soulignée par les cas d'hyperthyroïdies fœtales et néonatales transitoires corrélés à la présence de TSAb dans la circulation maternelle.



**Figure 7:** Dosage d'un anticorps par compétition



**Figure 8:** Dosage immunométrique d'un anticorps

➤ Autoanticorps bloquants :

Il existe aussi deux types d'anticorps bloquants : ceux qui inhibent la synthèse hormonale responsables d'une hypothyroïdie (TSII : thyroid synthesis inhibitory immunoglobulin) et ceux qui inhibent la croissance cellulaire provoquant une atrophie thyroïdienne (TG II : thyroid growth inhibitory immunoglobulin).

Les anticorps anti-récepteur de la TSH à activité bloquante inhibent la production d'AMPc induite par la TSH, ils sont retrouvés dans les hypothyroïdies autoimmunes mais leur présence est plutôt rare. Ce sont surtout les sujets atteints de thyroïdites atrophiques qui en sont détenteurs.

Toutefois, les anticorps anti-RTSH sont hétérogènes dans les sérums des patients atteints de la maladie de Basedow, et beaucoup contiennent les deux activités, bloquante et stimulante, le tableau clinique final dépend de la concentration relative et de l'affinité de chacun des anticorps.

Le rôle pathogène de ces anticorps est très bien illustré par les dysthyroïdies fœtales induites par le passage transplacentaire des anticorps maternels (20).

Les anticorps anti-RTSH constituent donc des outils précieux pour le diagnostic et le suivi de la maladie de Basedow et des dysthyroïdies fœtales (24).

*b- Le dosage des anticorps anti-thyroïdiens : méthodes et problèmes*

Pendant de nombreuses années, les techniques d'hémagglutination et de fluorescence, étaient les seules techniques utilisées, elles ont été progressivement remplacées par des techniques d'immunoanalyse.

- Les anticorps anti-TPO et anti-Tg

Les méthodes actuellement utilisées pour la recherche de ces anticorps sont le plus souvent des techniques par compétition (rarement immunométriques) avec des traceurs isotopiques, enzymatiques ou luminescents.

Lors de techniques par compétition, des anticorps monoclonaux entrent en compétition avec les anticorps circulants vis-à-vis de leur antigène cible marqué : la thyroglobuline ou la thyropéroxydase (*Figure 7*). Les conditions de réaction sont totalement différentes de celles obtenues lors du dosage d'une hormone (13). Lors d'un dosage hormonal, la constante d'affinité des anticorps impliqués dans le dosage et les sites de l'antigène contre lesquels ils sont dirigés sont parfaitement connus. La réaction immunologique qui repose sur la





compétition est donc bien contrôlée. Lors du dosage des anticorps, si les anticorps monoclonaux et l'antigène marqué sont bien définis, les constantes d'affinité des anticorps à doser ainsi que les sites épitopiques contre lesquels ils sont dirigés sont totalement inconnus et varient avec chaque patient mais aussi chez un même patient au cours du temps. Les principes fondamentaux de l'immunoanalyse, à savoir identité entre les substances qui entrent en compétition et identité entre la substance à doser et les étalons de la courbe standard ne sont pas respectés. En effet, en aucun cas le réactif anticorps entrant en compétition n'est identique aux anticorps présents dans les solutions de la gamme d'étalonnage. La réaction de compétition ne peut donc être maîtrisée. Le signal mesuré va dépendre de la concentration des anticorps présents dans le sérum mais aussi des constantes d'affinité de ces anticorps vis-à-vis du réactif antigène (13).

La présence d'antigène circulant (surtout valable pour la thyroglobuline mais peut-être aussi à concentration moindre pour la thyropéroxydase) vient ajouter un facteur supplémentaire de perturbation dans la mesure où les anticorps présents dans les complexes formés *in vivo* seront plus ou moins pris en compte (13).

Les méthodes immunométriques ne sont pas directement transposables au dosage des anticorps. L'alternative utilisée est la fixation de l'antigène sur un support solide ou l'utilisation d'un marqueur spécifique ou non, susceptible de se fixer aux IgG humaines (*Figure 8*).

Ces réactions ne tiennent pas compte des anticorps constitués d'immunoglobulines non IgG. Comme précédemment, les points de la courbe standard ne sont pas comparables à l'analyte dosé et la présence de l'antigène circulant va perturber le dosage.

Une troisième approche consiste à incuber l'antigène marqué avec le sérum puis à précipiter les complexes formés à l'aide d'un réactif non spécifique.

Ces multiples problèmes et imprécisions entraînent plusieurs conséquences :

- la concentration réelle et celle donnée par le dosage ont peu de chance d'être identiques et même si les standards de la réaction sont théoriquement calibrés sur un étalon international, les résultats (exprimés en unités), ne sont pas comparables d'un coffret à un autre ;

- la notion de négativité qui se réfère à un seuil (très différent selon les techniques utilisées) doit être interprétée avec beaucoup de précautions. Au niveau de ce seuil existe une incertitude liée au dosage et à l'affinité des autoanticorps. Suivant les réactifs utilisés, on pourra donc passer d'une valeur considérée comme négative à une valeur considérée comme positive.



- Les anticorps anti-RTSH

Les dosages des anticorps anti-RTSH utilisés en routine reposent sur une méthode basée sur l'inhibition de la liaison de la TSH radiomarquée à son récepteur spécifique (13). Durant ces quinze dernières années, le dosage des anti-RTSH était réalisé grâce à des trousse commerciales peu sensibles utilisant des récepteurs de la TSH d'abord d'origine porcine, puis bovine et enfin des récepteurs recombinants humains. Cette dernière méthode encore appelée «TRAK» (TSH Rezeptor AntiKörper) permet d'atteindre une sensibilité de 98% pour la recherche des anticorps, mais elle ne préjuge pas de leur activité (24, 25). La principale trousse pour le dosage TRAK utilise des radio-isotopes et de ce fait reste accessible à un nombre limité de laboratoire (25).

L'activité stimulante ou bloquante des anticorps peut être déterminée uniquement par mesure de leur effet biologique (détermination de la concentration en AMPc) sur une culture de cellules exprimant le récepteur à la TSH.

Les dosages utilisés pour les paramètres du bilan thyroïdien reposent donc sur des méthodes d'immunoanalyse qui se distinguent les unes des autres par leur mode de quantification et par la nature du traceur utilisé.

Dans notre travail, nous avons comparé une méthode radioimmunologique manuelle à une méthode de chimiluminescence automatisée sur un appareil mis à notre disposition par la société Beckman Coulter : l'UniCel DxI 800®, et ce pour l'ensemble des paramètres biologiques de l'exploration thyroïdienne.

### **I.1.2- Les recommandations de consensus**

Etant donné le nombre de paramètres disponibles pour le diagnostic mais aussi la surveillance des maladies thyroïdiennes, une augmentation des coûts était à craindre. Cela a fait apparaître la nécessité d'une rationalisation de l'exploration thyroïdienne sous l'angle du rapport bénéfice/coût. En plus des recommandations médicales opposables, différents organismes se sont attachés à mettre en place des consensus, notamment l'ANAES qui a diffusé des recommandations pour la pratique clinique concernant le diagnostic et la surveillance biologique de l'hypothyroïdie (26) et de l'hyperthyroïdie (27).

Les Références Médicales Opposables n'autorisent pas le dosage des hormones thyroïdiennes chez un patient asymptomatique (RMO XIV, 1993) (28).

Le bilan biologique thyroïdien doit être motivé par des signes d'appel d'hyperthyroïdie (asthénie, amaigrissement, thermophobie, sudation, diarrhée) ou d'hypothyroïdie (au contraire prise de poids, frilosité, constipation) (2).

	<b>Diagnostic positif de l'hyperthyroïdie</b>	<b>Diagnostic étiologique</b>
<i>Examen de 1<sup>ère</sup> intention</i>	TSH	
<i>Examens de 2<sup>ème</sup> intention</i>	T4l et éventuellement T3l si T4l normale et TSH basse	AC anti-TPO (hyperthyroïdie autoimmune) AC anti-RTSH (maladie de Basedow) Thyroglobuline (thyrotoxicose factice) Iodémie/Iodurie (hyperthyroïdie iatrogène) VS, CRP (thyroïdite subaiguë de De Quervain) Test à la TRH (adénome thyroïdote, résistance aux hormones thyroïdiennes)
<i>Examens inutiles</i>	Test à la TRH sauf situation exceptionnelle AC anti-TPO, AC anti-Tg, AC anti-RTSH Thyroglobuline <i>Thyroxin binding globulin</i> Iodémie/Iodurie VS, CRP	

AC: anticorps

**Tableau 5** : Utilité des examens pour le diagnostic positif et étiologique d'une hyperthyroïdie (27).

Dans le cadre du diagnostic biologique d'une hyper ou d'une hypothyroïdie, l'ANAES recommande en première intention le dosage de la TSH qui est l'élément central du bilan thyroïdien (*Tableaux 5 et 6*). Il permet un dépistage très performant et très économique des dysfonctionnements thyroïdiens. Devant un résultat discordant avec la clinique, il faut refaire le dosage de la TSH associé à un dosage de la T4l qui permettra de confirmer le diagnostic et de préciser l'importance de la dysthyroïdie (franche, ou infraclinique) avant l'instauration d'une thérapeutique (26, 27). Le dosage de la T3l peut être envisagé en deuxième intention afin de différencier une hyperthyroïdie à T3 d'une hyperthyroïdie infraclinique dans le cas où la TSH est basse avec une T4l normale. La détermination de la concentration en T3l ne présente aucun intérêt dans l'exploration d'une hypothyroïdie compte tenu des fréquentes perturbations observées dans de nombreuses pathologies non thyroïdiennes.

Les recommandations de l'ANAES ne reconnaissent pas d'utilité au dosage des anticorps anti-thyroïdiens dans un bilan de première intention. La recherche de ces anticorps n'ayant qu'un intérêt purement étiologique. Le dosage des anticorps anti-thyroïdiens est justifié dans des situations particulières : recherche des anticorps anti-TPO, dans la surveillance de certains traitements médicamenteux et comme élément prédictif de thyroïdite du post-partum, du passage d'une hypothyroïdie infra clinique à une hypothyroïdie franche ; des anticorps anti-récepteur de la TSH comme marqueur de récurrence de la maladie de Basedow à l'arrêt de traitement et de thyrotoxicose foetale. Le dosage des anticorps anti-thyroglobuline est quant à lui obligatoire lorsqu'il rentre dans le cadre du suivi des cancers différenciés de la thyroïde afin de valider le dosage de la thyroglobuline.

### **I.1.3- Les variations du bilan biologique thyroïdien**

#### **I.1.3.1- Lors d'hyperthyroïdie**

Quand la TSH est abaissée et une hyperthyroïdie suspectée, l'élévation de la T4l permet de graduer l'hyperthyroïdie franche. Si la T4l est normale, la T3l sera dosée à la recherche d'une hyperthyroïdie à T3 rencontrée le plus souvent en présence de nodule thyroïdien (5% des hyperthyroïdies) (6). En revanche, si le résultat est comme celui de la T4l normal, l'hyperthyroïdie est dite infraclinique.

Une fois le diagnostic d'hyperthyroïdie établi, des dosages complémentaires peuvent être réalisés en deuxième intention : les anticorps anti-TPO et anti-récepteur de la TSH pour le diagnostic étiologique, la détermination de l'iodémie ou de l'iodurie pour détecter une surcharge iodée et plus exceptionnellement la thyroglobuline pour mettre en évidence une hyperthyroïdie factice.

	<b>Diagnostic</b>
<i>Examen de 1<sup>ère</sup> intention</i>	TSH
<i>Examens de 2<sup>ème</sup> intention</i>	T4l AC anti-TPO Test à la TRH (suspicion d'hypothyroïdie secondaire ou tertiaire)
<i>Examens inutiles</i>	T3l Autres dosages immunologiques Thyroglobuline Iodurie

**Tableau 6** : Utilité des examens pour le diagnostic d'une hypothyroïdie (26).

### **I.1.3.2- Lors d'hypothyroïdie**

Lorsque la TSH est augmentée et une hypothyroïdie suspectée, l'abaissement de la T4l confirme l'hypothyroïdie franche. L'hypothyroïdie infraclinique est définie par une TSH modérément élevée et une T4l encore normale. L'enquête étiologique d'une hypothyroïdie franche comprend le dosage des anticorps anti-TPO, anti-Tg si les anticorps anti-TPO sont négatifs et éventuellement des anticorps anti-RTSH. Dans l'hypothyroïdie infraclinique, le dosage des anticorps anti-TPO constitue un élément pronostic.

Le dosage de la T3l n'a pas de place dans le diagnostic de l'hypothyroïdie car sa concentration est souvent normale dans les hypothyroïdies modérées et s'abaisse dans de nombreuses circonstances en dehors de toutes pathologies thyroïdiennes, on parle de « syndrome à basse T3 » (6). Il s'agit d'un épiphénomène secondaire à une agression clinique ou métabolique réversible avec l'amélioration de l'affection causale. Ce syndrome est fréquemment observé chez les patients hospitalisés atteints de maladies aiguës ou chroniques, au décours d'interventions chirurgicales, de traumatismes et dans la plupart des situations s'accompagnant d'une carence énergétique.

## **I.2- Maladies thyroïdiennes autoimmunes**

Dans les pays où l'apport en iode est suffisant, les pathologies thyroïdiennes ont pour la plupart une cause autoimmune. Les maladies thyroïdiennes autoimmunes (MTAI) se présentent selon un large éventail de manifestations cliniques avec ou sans goitre, avec un degré variable de dysfonctionnement thyroïdien, allant de l'hypothyroïdie avec atrophie thyroïdienne à l'hyperthyroïdie par la maladie de Basedow.

Ces maladies, survenant sur un terrain génétique prédisposé, ont en commun la présence d'un infiltrat lymphocytaire intrathyroïdien et des autoanticorps circulants dirigés contre les constituants de la glande thyroïde. Leur prévalence est de 4% dans la population générale et peut s'élever jusqu'à 16% chez les femmes âgées (15). L'expression clinique et évolutive de ces MTAI est variable. Ces pathologies autoimmunes thyroïdiennes sont très fréquemment associées à d'autres maladies autoimmunes spécifiques d'organes (maladie de Biermer, lupus, vitiligo, maladie d'Addison, myasthénie) ou systémiques (polyendocrinopathies autoimmunes de type I et II) (17). L'étiopathogénie des maladies autoimmunes thyroïdiennes est mieux appréhendée grâce au progrès notable dans la connaissance des antigènes thyroïdiens, de leurs épitopes, des anticorps et de leur activité pathogène éventuelle.





Il n'existe aucune classification officielle et consensuelle des MTAI. Il est cependant fréquent d'opposer les MTAI spontanées aux MTAI iatrogènes.

### **I.2.1- Les maladies thyroïdiennes autoimmunes spontanées**

Au sein de ce groupe on retrouve les thyroïdites lymphocytaires, pouvant être chroniques ou bi phasiques, regroupant différentes entités cliniques et la maladie de Basedow.

#### **I.2.1.1- Thyroïdites lymphocytaires chroniques**

Les thyroïdites lymphocytaires chroniques sont les MTAI les plus fréquentes. Sous leurs diverses formes elles touchent 0,5 à 4% de la population générale. Elles sont quatre à cinq fois plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes, avec une prévalence de 10 à 15% dans la population générale féminine contre 3 à 5% chez les hommes (17). Leur fréquence augmente aussi avec l'âge, avec une prévalence qui atteint 33% chez les femmes âgées de plus de 70 ans (29). Elles regroupent plusieurs présentations cliniques : la maladie de Hashimoto, la thyroïdite lymphocytaire de l'adolescent et la thyroïdite atrophique.

##### *a- Maladie de Hashimoto*

C'est la plus fréquente des thyroïdites lymphocytaires chroniques, affectant la femme d'âge moyen. Elle est définie sur le plan anatomopathologique comme une thyroïdite lymphocytaire avec goitre. Le tissu thyroïdien normal composé de structure folliculaire est détruit et remplacé par un infiltrat de cellules lymphocytaires (lymphocytes T et B) organisées en centres germinaux lymphoïdes (30). Le goitre est de volume variable, souvent irrégulier, de consistance ferme évoluant habituellement vers l'atrophie. La fonction thyroïdienne est longtemps normale avant d'évoluer vers l'insuffisance thyroïdienne. Les anticorps anti-thyropéroxydase sont présents à des titres élevés dans plus de 90% des cas, souvent associés aux anticorps anti-thyroglobuline. Les anticorps anti-récepteur de la TSH sont quant à eux retrouvés dans moins de 10 % des cas. L'échographie thyroïdienne et la scintigraphie, non nécessaires au diagnostic, montrent respectivement une hypoéchogénéicité et une fixation diminuée et hétérogène (17).

##### *b- Thyroïdite lymphocytaire des adolescents*

Elle constitue à cet âge, la cause la plus commune des goitres en dehors de la carence iodée. L'évolution est variable, des régressions sont possibles dans un quart des cas et dans un tiers des cas les patients développeront une hypothyroïdie définitive. Il existe souvent un



contexte familial de MTAI. La fonction thyroïdienne est normale ou montrant une hypothyroïdie infra clinique ; les anticorps anti-TPO sont généralement présents à des titres élevés.

#### *c- Thyroïdite atrophique (myxoedème primitif)*

Il s'agit d'une variante de la thyroïdite de Hashimoto, notablement moins fréquente. Le myxoedème primitif correspond à des formes destructrices ou atrophiantes d'emblée. Il peut survenir à tout âge. La maladie est alors découverte devant une insuffisance thyroïdienne, souvent intense.

#### *d- Hypothyroïdies infra cliniques*

Elles sont caractérisées par des taux d'hormones thyroïdiennes périphériques dans les normes du laboratoire, tandis que la TSH est discrètement élevée (inférieure à 10 mUI/l). La plupart semble d'origine autoimmune compte tenu du fait que des anticorps anti-thyroïdiens sont retrouvés dans 50 à 60% des cas. La détérioration autoimmune de la fonction thyroïdienne évoluant parallèlement à la progression de l'âge (17).

### **I.2.1.2- Thyroïdites lymphocytaires biphasiques**

#### *a- Thyroïdite silencieuse*

La thyroïdite silencieuse ou indolore ressemble à la thyroïdite subaiguë virale par son début rapide ; elle s'en distingue par l'absence habituelle de toute douleur locorégionale, et une consistance moins dure à la palpation. Il existe un petit goitre ferme, non douloureux. L'histologie montre un infiltrat lymphocytaire. L'évolution de la thyroïdite silencieuse est typiquement bi phasique. Elle débute par une phase d'hyperthyroïdie liée à une cytolysé des cellules thyroïdiennes. Cette phase est rapidement résolutive en quelques semaines. Elle est habituellement suivie par une phase d'hypothyroïdie, transitoire dans 75% des cas. Les anticorps anti-TPO et anti-Tg sont présents ; les anticorps anti-RTSH sont absents.

#### *b- Thyroïdite du post-partum*

Elle est définie comme un dysfonctionnement thyroïdien transitoire ou permanent survenant dans l'année qui suit l'accouchement. Souvent méconnue car infra clinique la thyroïdite du post-partum semble compliquer 4 à 8% des grossesses selon les séries. L'étiologie autoimmune de cette entité est étayée par la forte prévalence des anticorps anti-TPO au cours de la grossesse (15). La présentation clinique est celle d'une thyroïdite subaiguë, avec une première phase d'hyperthyroïdie au 2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> mois du post-partum, suivie d'une phase d'hypothyroïdie au 6<sup>ème</sup>-8<sup>ème</sup> mois, transitoire ou permanente. Le caractère



récidivant à chaque grossesse est classique. Les thyroïdites du post-partum surviennent trois fois plus chez les femmes présentant un diabète de type I que dans la population générale (17)(31).

### **I.2.1.3- Maladie de Basedow**

A l'autre pôle du spectre des MTAI, la maladie de Basedow, ou maladie de Graves, est une affection multifocale associant une hyperthyroïdie et d'autres manifestations de fréquence variable, ophtalmopathie et myxoedème pré-tibial (17). La maladie de Basedow est la cause la plus fréquente des hyperthyroïdies (80% des cas) (4). Elle atteint 0,4% à 2% de la population avec un sex-ratio de 10 femmes pour 1 homme (15). Elle survient préférentiellement chez les individus jeunes entre 30 et 50 ans. La glande thyroïde est hyperfonctionnelle dans son ensemble, souvent de volume augmenté, et hypervasculaire. Il existe un infiltrat lymphocytaire plus ou moins marqué, avec amas lymphoïde à centre clair. La scintigraphie thyroïdienne montre un corps thyroïde souvent augmenté de volume et avide d'iode. Les anticorps anti-RTSH spécifiques sont présents dans 90% des cas. Il s'agit le plus souvent d'anticorps stimulants, expliquant l'hyperfonctionnement thyroïdien. Les anticorps anti-TPO sont également fréquemment positifs.

Le tableau clinique de la maladie de Basedow comporte 3 volets (23) :

- *le syndrome de thyrotoxicose* : dans sa forme typique, il s'agit d'une femme jeune, avec éclat du regard, un goitre visible et un comportement agité. Les signes de thyrotoxicose sont généralement francs : amaigrissement, tachycardie et tremblements. Ces signes d'hyperthyroïdie s'accompagnent fréquemment de manifestations liées à l'étiologie de la maladie de Basedow (exophtalmie vraie, goitre typique...) qui orientent le diagnostic ;

- *le goitre* : le goitre est caractéristique car homogène, élastique et surtout vasculaire (perception d'un frémissement à la palpation ou d'un souffle systolique ou continu à l'auscultation). Ses autres caractéristiques sont : diffus, indolore et symétrique ;

- *les manifestations extra thyroïdiennes* : elles sont pathognomoniques de la maladie de Basedow.

\* L'ophtalmopathie de Basedow : il s'agit d'une affection auto-immune atteignant les tissus extra oculaires du cône orbitaire. L'atteinte de l'orbite est quasi constante mais cliniquement patente dans 40% des cas environ. Cette ophtalmopathie survient dans 40% des cas lors du diagnostic de l'hyperthyroïdie basedowienne, dans 40% des cas lors du traitement et dans 20% des cas avant (17). Les cibles de la réaction auto-immune sont les muscles extra oculaires ou les fibroblastes sécrétant du tissu conjonctif dont



l'accumulation repousse mécaniquement en avant les globes oculaires. L'apparition de l'orbitopathie se produit le plus souvent après déclaration de l'hyperthyroïdie clinique, sur un terrain génétique prédisposé, à la faveur d'environnements déclenchants ou aggravants : tabac, iode radioactif, lithium. Les exophtalmies sont plus fréquentes et plus sévères chez des patients présentant des titres élevés d'anticorps anti-RTSH.

\* Le myxoedème pré tibial est rare il se développe dans 0,5 à 5% des cas (17). Il accompagne les formes sévères de la maladie de Basedow avec toujours la présence d'une ophtalmopathie patente. Il se manifeste par un œdème un peu dur des jambes, ne prenant pas le godet. Il s'agit d'une infiltration par des mucopolysaccharides du derme de la région pré tibiale et du dos des pieds, épaississant la peau.

#### **I.2.1.4- Les formes mixtes : « Hashitoxicose »**

Maladie de Basedow et thyroïdite lymphocytaire paraissent pouvoir coexister. Le nom de « Hashitoxicose » a été suggéré dans ce cas, caractérisée par l'association séquentielle quel que soit l'ordre, d'une hyper et d'une hypothyroïdie.

Enfin, il existe des thyroïdites autoimmunes iatrogènes dont le tableau clinique est plus volontiers celui d'une hypothyroïdie régressant de façon inconstante à l'arrêt du traitement incriminé justifiant une surveillance biologique particulière.

### **I.2.2- Maladies thyroïdiennes autoimmunes iatrogènes**

#### **I.2.2.1- Iode**

L'effet d'une surcharge en iode sur la fonction thyroïdienne est souvent imprévisible, neutre ou responsable d'hypo ou d'hyperthyroïdie. Les dysfonctions sont habituellement transitoires, parallèlement à l'élimination de la surcharge iodée. Le mécanisme autoimmun est discuté. En effet, l'exposition à l'iode peut favoriser une thyroïdite lymphocytaire chez de nombreux animaux, et chez l'homme la prévalence des anticorps anti-thyroïdiens est plus forte (30 à 50% des sujets traités par l'amiodarone) et l'infiltrat lymphocytaire est plus fréquent que chez les sujets contrôles. Cependant, les dysthyroïdies dues à des apports élevés en iode sembleraient plus liées à une moindre sécrétion d'hormones thyroïdiennes par effet Wolff-Chaikoff, ou à l'inverse à un emballement (17).

#### **I.2.2.2- Le lithium**

Largement utilisé en psychiatrie, en particulier dans le traitement des psychoses maniacodépressives, le lithium agit sur les mêmes cibles que les anti-thyroïdiens de synthèse :





il inhibe la captation de l'iode, bloque le couplage des iodotyrosines, altère la structure de la thyroglobuline et inhibe la sécrétion des hormones thyroïdiennes.

Il en résulte que 30% des patients traités par le lithium présentent une dysthyroïdie, le plus souvent sous la forme d'hypothyroïdie avec goitre. Il a été décrit que les anticorps anti-TPO étaient deux fois plus fréquents chez ces patients traités que dans la population générale (17). Il semblerait cependant que le lithium n'induit pas directement l'apparition des anticorps anti-TPO mais provoque une élévation du titre d'anticorps préexistant par stimulation du système immunitaire (32). On décrit également d'authentiques maladies de Basedow, voire des « Hashitoxicoses » liées au lithium. Dans environ 50% des cas, les hypo- comme les hyperthyroïdies sont réversibles à l'arrêt du lithium.

### **I.2.2.3- Cytokines et immunothérapies**

L'injection de cytokines, INF  $\alpha$  et  $\beta$ , IL2, de granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), utilisés en particulier dans l'hépatite C, la sclérose en plaques, les cancers et syndromes myéloprolifératifs, donne lieu dans 20% des cas à l'apparition d'anticorps anti-thyroïdiens et dans 9% des cas à des dysthyroïdies autoimmunes, ordinairement réversibles : hypothyroïdies (5%), hyperthyroïdies (2%), thyroïdites silencieuses biphasiques (2%) (17).

### **I.2.2.4- Allogreffe médullaire**

Plusieurs cas d'hyper- et hypothyroïdies ont été décrits après greffe de moelle osseuse allogénique provenant d'un donneur atteint ou aux antécédents de MTAI, en situation d'identité HLA (17). Ces cas mettent en évidence le rôle prépondérant des cellules lymphocytaires dans la pathogénie des MTAI.

### **I.2.2.5- Irradiation thyroïdienne**

Trente pour cent des enfants et adolescents ayant bénéficié d'une irradiation cervicale pour maladie de Hodgkin, même à thyroïde protégée, présentent une thyroïdite autoimmune (33). Il s'agit le plus souvent de l'apparition isolée d'anticorps anti-thyroïdiens. La prévalence maximale survient 6 ans après l'irradiation.

Par ailleurs, la prévalence des anticorps anti-thyroïdiens est cinq fois plus élevée chez les enfants irradiés au cours de l'accident de la centrale nucléaire de Tchernobyl, en 1986, que chez les enfants présentant une carence iodée similaire, mais sans contamination radioactive. L'altération des cellules thyroïdiennes par l'irradiation pourrait entraîner leur reconnaissance par le système immunitaire comme le non soi.

	<b>PEA type I</b>	<b>PEA type II</b>
<i>Date début</i>	Enfance (< 10 ans)	Age adulte (> 30 ans)
<i>Sexe</i>	M = F	F > M
<i>Génétique</i>	Autosomique récessif gène <i>AIRE</i> (auto-immune regulator), chromosome 21	Polygénique avec antécédents familiaux dans 50% des cas lié à HLA DR3 et/ou DR4DQ8
<i>Clinique</i>	deux éléments de la triade ± autres atteintes autoimmunes	
<i>Triade</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- candidose cutanéomuqueuse (75-100%)</li> <li>- hypoparathyroïdie (80%)</li> <li>- insuffisance surrénale (70%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- insuffisance surrénale</li> <li>- hypothyroïdie (80%)</li> <li>- diabète de type I</li> </ul>
<i>Autres</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dystrophie ectoderme (35%)</li> <li>- malabsorption intestinale (25-30%)</li> <li>- hypogonadisme primaire (15% H/ 60% F)</li> <li>- alopecie (30%)</li> <li>- diabète de type I (12%)</li> <li>- maladie de Biermer (13%)</li> <li>- hépatites (12%)</li> <li>- vitiligo (13%)</li> <li>- autres</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- maladie coeliaque (5%)</li> <li>- maladie de Biermer (5%)</li> <li>- vitiligo (5%)</li> <li>- ménopause précoce (5-10%)</li> <li>- alopecie</li> <li>- hépatites chroniques</li> <li>- autres</li> </ul>

**Tableau 7:** Polyendocrinopathies autoimmunes (PEA) (17).

### **I.2.3- Les polyendocrinopathies autoimmunes (PEA)**

L'autoimmunité thyroïdienne est souvent associée à d'autres manifestations d'autoimmunité spécifiques d'organes ou plus rarement systémiques, on parle de polyendocrinopathies autoimmunes. Il existe deux types de PEA dont les caractéristiques sont résumées dans le *Tableau 7*.

Dans la troisième partie de ce travail nous nous sommes intéressés à l'association éventuelle de la dysimmunité thyroïdienne à de la dysimmunité gastrique plus particulièrement la maladie de Biermer. L'ensemble des patients ayant présenté des signes biologiques de dysthyroïdies a bénéficié d'une recherche des anticorps anti-facteur intrinsèque, autoanticorps actuellement les plus spécifiques de cette pathologie.

### **I.2.4- Pathogénie des maladies autoimmunes de la thyroïde**

Les maladies autoimmunes spécifiques d'organes résultent d'une rupture de la tolérance centrale et périphérique du fait de facteurs génétiques et environnementaux. Les mécanismes immunopathologiques font intervenir aussi bien l'immunité cellulaire que l'immunité humorale.

#### **I.2.4.1- Facteurs génétiques**

L'influence de la génétique est suggérée par la fréquence excessive des MTAI et la présence d'anticorps anti-thyroïdiens dans certaines familles, touchant jusqu'à 50 % des apparentés au premier degré. Parallèlement, le taux de concordance de survenue de la maladie de Basedow est plus élevé chez les jumeaux monozygotes que chez les dizygotes. Cette prédisposition n'est que partiellement sous le contrôle du système HLA, avec un taux de concordance de 7% chez les apparentés HLA identiques. Dans la maladie de Basedow et la thyroïdite chronique autoimmune, l'haplotype HLA B8-DR3, lié à DRB1\*0304-DQB1\*0201-DQA1\*0501, augmente d'un facteur de 3,4 le risque relatif. Le groupe DR5, lié à DQB1\*0301, est associé de la même façon à la thyroïdite de Hashimoto et à la thyroïdite du post-partum (17, 23). Cependant, l'implication du système HLA est moins forte dans les MTAI que dans les autres maladies autoimmunes comme le diabète de type I. Le polymorphisme GC ou AG du codon 17 du gène *CTLA-4* est associé aux maladies de Basedow et de Hashimoto, ainsi qu'à l'exophtalmie basedowienne (17, 23).



## I.2.4.2- Facteurs environnementaux

### a- Les infections

La responsabilité de certaines infections a été évoquée dans le déclenchement de maladies thyroïdiennes autoimmunes. Plusieurs hypothèses ont été émises (17, 23) :

- un mimétisme moléculaire entre un épitope antigénique issu d'un agent infectieux et un antigène thyroïdien, conduirait à une réaction croisée ;

- l'infection induirait l'expression de molécules de classe II sur les thyrocytes (sous l'effet d'INF $\gamma$  sécrété par les lymphocytes T activés) et rendrait possible la présentation d'autoantigènes par les cellules thyroïdiennes aux lymphocytes T ;

- l'agent infectieux produirait un super antigène qui stimulerait directement les lymphocytes T autoréactifs.

Parmi les infections virales, la rubéole congénitale est associée à la présence d'autoanticorps anti-thyroïdiens circulant dans 20 à 30% des cas et à une dysthyroïdie clinique. Le rôle des rétrovirus dans la maladie de Basedow a également été étudié mais non confirmé.

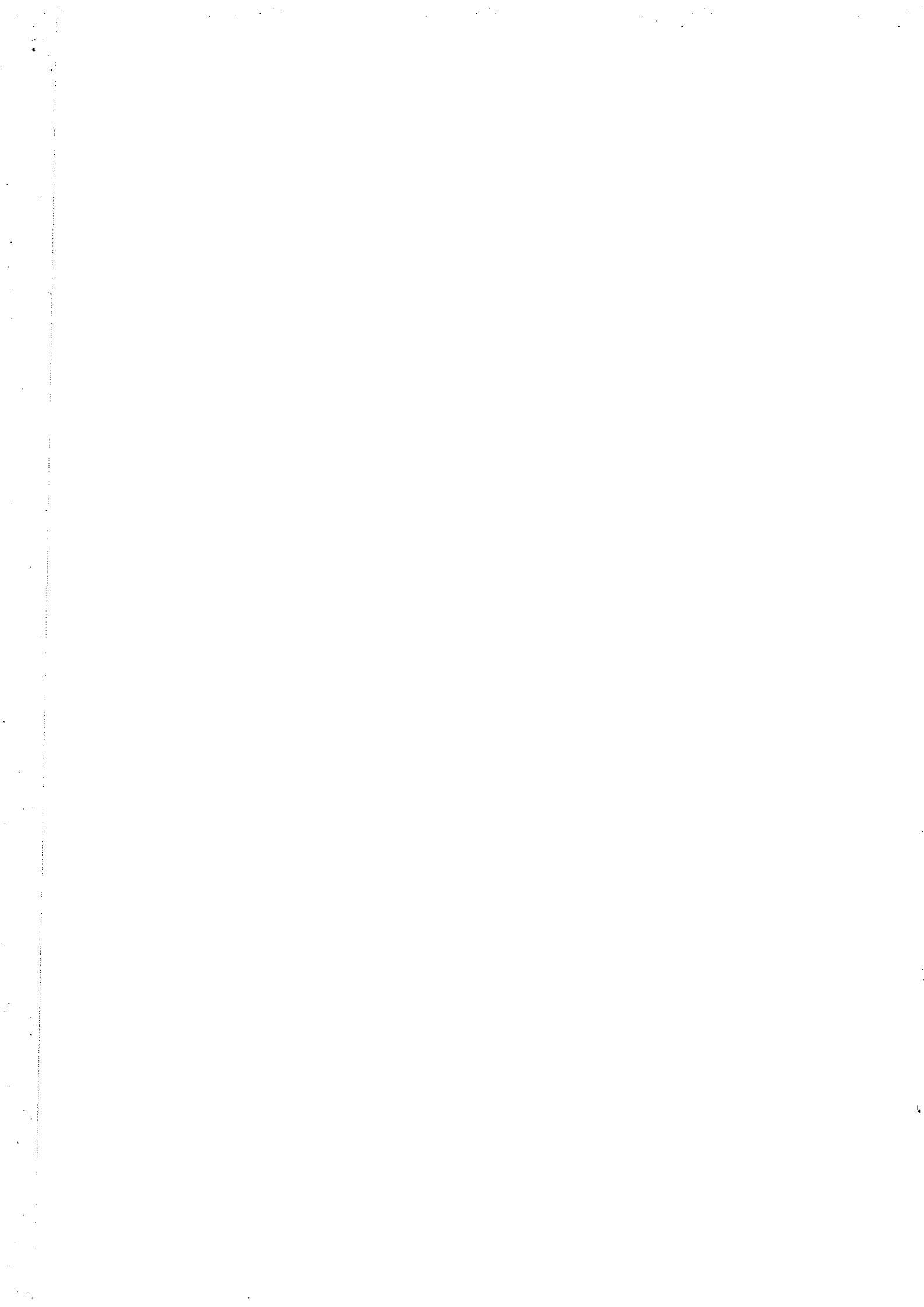
Parmi les agents bactériens, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, et les mycoplasmes ont été mis en cause en raison de structures antigéniques et fonctionnelles similaires à celles du récepteur de la TSH.

### b- Facteurs métaboliques nutritionnels et hormonaux

Le rôle de l'iode et du lithium a été discuté précédemment. Le tabac favorise surtout l'apparition de l'exophtalmie dans la maladie de Basedow, avec un titre plus élevé des anticorps anti-récepteur de la TSH chez des basedowiens fumeurs. L'effet du tabac reste inexpliqué. Le tabac augmenterait aussi l'incidence de la thyroïdite du post-partum (17).

### c- Stress et facteurs psychologiques

L'expérience suggère fortement la participation de composants psychologiques dans le déclenchement des MTAI, plus apparente toutefois pour la maladie de Basedow que pour les thyroïdites. L'hypothèse d'un effet révélateur par le stress d'une anomalie jusque-là infraclinique est tout à fait plausible, bien que d'analyse difficile. Le stress tend à déprimer les fonctions immunosuppressives et un tel effet pourrait affecter d'autant plus des individus déjà prédisposés. L'axe corticotrope, le système adrénergique et le système des opioïdes semblent être impliqués (17).



### **I.2.4.3- Immunité humorale**

Les thyrocytes expriment de nombreux antigènes pouvant servir de cibles aux autoanticorps. Les principaux antigènes sont le récepteur de la TSH (RTSH), la thyroperoxydase (TPO), la thyroglobuline (Tg) et plus récemment, le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS). La pathogénécité de ces anticorps est discutée sauf dans le cas de la maladie de Basedow où le rôle stimulant des anticorps anti-RTSH est démontré. Les autoanticorps anti-TPO et anti-Tg sont à la fois retrouvés dans les thyroïdites autoimmunes et la maladie de Basedow (30).

La description de ces autoanticorps (anti-TPO, anti-Tg et anti-RTSH), et de leur cibles antigéniques ainsi que leurs fréquences respectives dans les différentes pathologies thyroïdiennes ont déjà été envisagées précédemment.

Quantitativement moindre, d'autres autoanticorps peuvent être observés au cours de pathologies thyroïdiennes autoimmunes : les anticorps anti-T3, anti-T4 et anti-TSH. Ce sont le plus souvent des IgG polyclonales qui seraient une sous population des anticorps anti-Tg. Ces IgG peuvent être responsables d'artéfacts de dosage dans l'évaluation des concentrations de T3I et T4I. Ils sont habituellement sans effet sur l'action biologique des hormones (15).

Des anticorps anti-T4 et anti-T3 sont détectés chez environ 5 % des patients atteints de MTAI (17).

La présence d'anticorps anti-TSH circulant a été rapportée. Elle est exceptionnelle et concerne des patients présentant un contexte autoimmun important. Son évocation sera faite devant des concentrations inappropriées de TSH (15).

### **I.2.4.4- Immunité cellulaire**

Les mécanismes mis en jeu dans la cytotoxicité thyroïdienne sont diversifiés (30). L'intensité de l'infiltration lymphocytaire intrathyroïdienne en est le reflet (16).

Plusieurs études in vitro ont révélé l'existence d'une immunité à médiation cellulaire vis-à-vis des antigènes thyroïdiens dans les thyroïdites autoimmunes mais aussi dans la maladie de Basedow (16).

Dans les MTAI, les manifestations cliniques traduisent l'interaction des effecteurs du système immunitaire avec le tissu cible, la thyroïde. Les modifications tissulaires sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes B et T et de cellules présentant l'antigène. La présence des lymphocytes T est remarquable dans les maladies autoimmunes dont les mécanismes effecteurs mettent en jeu des lymphocytes T (thyroïdites autoimmunes), mais aussi dans les maladies dont les mécanismes effecteurs dépendent





d'autoanticorps (maladie de Basedow) indiquant dans tous les cas l'importance en amont des lymphocytes T. La prédominance des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ au sein de l'infiltrat varie selon le stade de la maladie au moment où le tissu atteint est analysé.

Les lésions tissulaires observées sont complétées par la disparition plus ou moins complète des cellules cibles conduisant cliniquement à un déficit de sécrétion hormonale (thyroïdites autoimmunes).

A l'inverse, dans la maladie de Basedow médiée par les autoanticorps anti-récepteur de la TSH, l'hyperplasie et l'hypertrophie de l'organe cible traduisent un hyperfonctionnement des cellules endocrines (23).

Récemment, il a été mis en évidence un rôle de l'apoptose et du tandem Fas/Fas ligand (Fas-L) dans la pathogénie des thyroïdites autoimmunes (15). Le maintien du volume de la thyroïde résulte d'un équilibre entre l'action trophique de la TSH et l'apoptose des thyrocytes qui à l'état normal, expriment Fas mais peu son ligand : Fas-L. Dans la thyroïdite de Hashimoto, la disparition des cellules résulterait d'un déséquilibre entre la régénération cellulaire restée normale et l'apoptose fortement augmentée du fait de la surexpression de Fas-L par le thyrocyte (34). Ce déséquilibre apoptotique peut également expliquer la prolifération thyrocytaire observée dans la maladie de Basedow, où l'action trophique de la TSH fortement augmentée supplante l'action de l'apoptose thyrocytaire restée normale.



## **II- DYSIMMUNITE GASTRIQUE : LA MALADIE DE BIERMER**

Les maladies autoimmunes du tube digestif sont dominées par les gastrites autoimmunes et la maladie coeliaque. La maladie de Biermer est une gastrite atrophique autoimmune responsable d'une carence en vitamine B12 (cobalamine) par malabsorption, en raison du tarissement de la production du facteur intrinsèque (35). Sa traduction hématologique classique est une anémie macrocytaire. Cependant cette affection peut-être diagnostiquée en l'absence de toute anémie ou autre anomalie hématologique, souvent sur des signes neurologiques ou encore dans un contexte de maladies autoimmunes, c'est pour cette raison que le terme de maladie de Biermer est préféré à celui d'anémie de Biermer.

### **II.1- Epidémiologie**

La maladie de Biermer représente dans la littérature plus de 70% des anémies macrocytaires mégalo-blastiques par carence en vitamine B12. La prévalence dans la population générale est estimée à 0,1% (36). Cette pathologie touche plus les femmes que les hommes, et les individus concernés ont majoritairement les yeux bleus et sont de groupe sanguin A. D'abord localisée au nord de l'Europe en particulier dans les pays scandinaves, d'autres études ont montré qu'elle touchait aussi la population noire et latino-américaine avec comme particularité un plus jeune âge au diagnostic chez la femme noire (37, 38). L'âge moyen de survenue est de 60 ans. La prévalence au-delà de 60 ans varie de 2% (39) à 4% (40) selon les auteurs. Cependant, la maladie peut survenir aux alentours de la trentaine souvent alors en association avec d'autres maladies autoimmunes. En effet, un certain nombre de maladies autoimmunes surviennent avec une fréquence plus élevée chez les patients ayant une maladie de Biermer ou encore chez les membres de la famille de patients biermériens. Elles peuvent précéder la maladie de Biermer ou survenir au décours de cette affection. Les pathologies les plus fréquemment associées sont : la thyroïdite de Hashimoto, la maladie de Basedow, la maladie d'Addison, le vitiligo, le diabète de type I ou encore l'hypogammaglobulinémie acquise (35). L'association maladie de Biermer affections thyroïdiennes est la plus fréquemment rapportée (41). L'association fréquente à d'autres maladies autoimmunes, en particulier endocriniennes, trouve son explication dans l'existence d'un terrain génétique prédisposant pour la maladie de Biermer, classiquement HLA B8 DR3 pour les caucasiens. L'association de la maladie de Biermer avec de nouveaux gènes



prédisposant notamment au syndrome autoimmun multiple comme le gène *AIRE* reste à étudier (42).

## **II.2- Gastrite autoimmune**

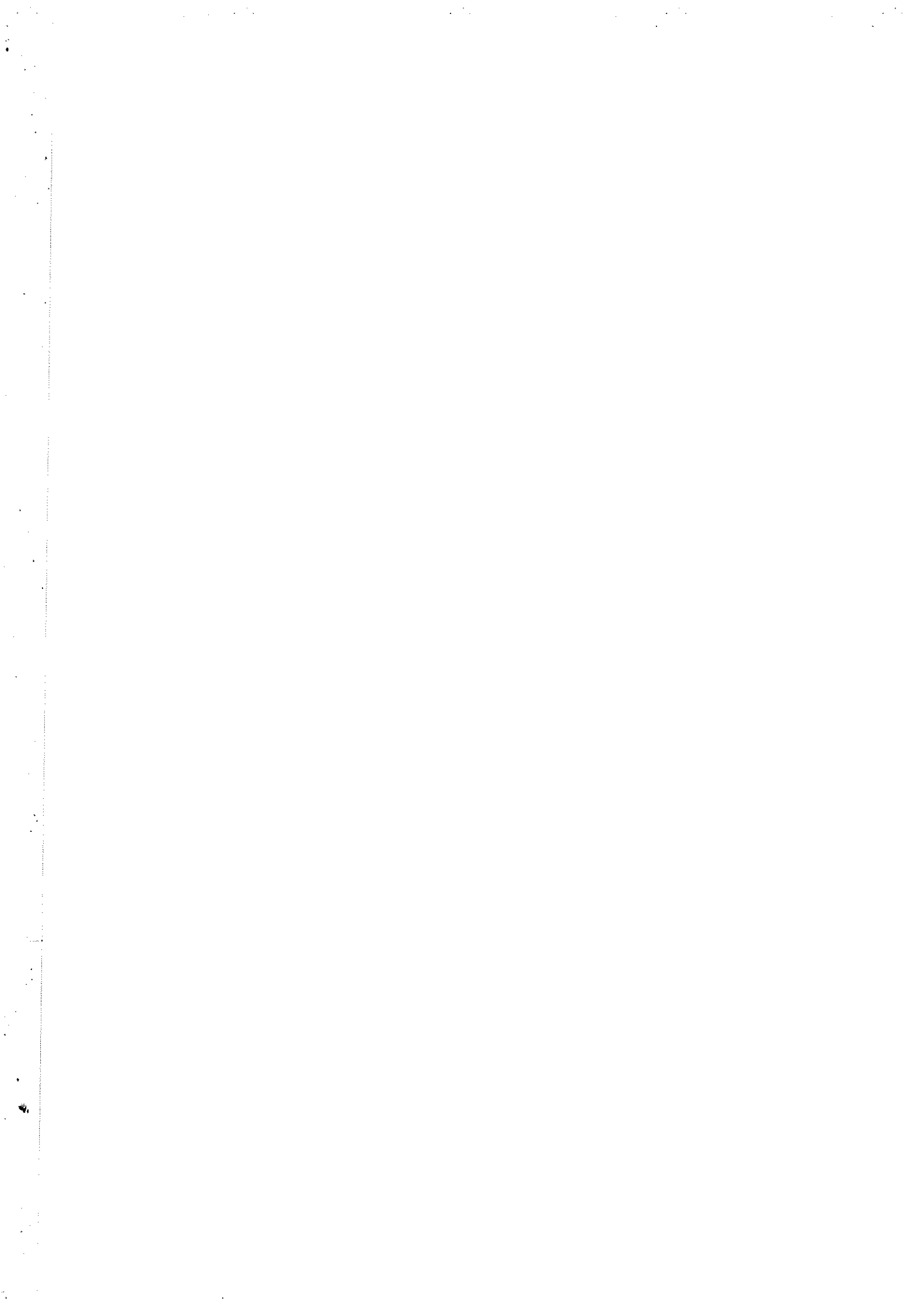
### **II.2.1- La lésion gastrique**

#### **II.2.1.1- Macroscopie**

L'estomac comprend 3 régions : le corps, le fundus et l'antrum. Chacune de ces régions présente des cellules spécifiques. Le corps et le fundus contiennent des cellules pariétales sécrétant de l'acide et les cellules principales (ou zymogéniques) sécrétant du pepsinogène alors que l'antrum contient les cellules productrices de gastrine. L'examen endoscopique d'un patient biermérien montre une perte des plis de la muqueuse du fundus et du corps avec un respect de l'antrum ou au minimum des lésions superficielles focales et peu intenses (39). Cet aspect est typique d'une gastrite chronique atrophique de type A ou autoimmune par opposition à celle de type B n'épargnant pas l'antrum (43, 44). Cette atrophie de type A est associée à une fréquence élevée d'anticorps anti-cellules pariétales, d'anticorps anti-facteur intrinsèque, d'achlorhydrie, de diminution de pepsinogène I et d'hypergastrinémie (par hyperplasie des cellules endocrines de la muqueuse antrale qui sont stimulées par l'augmentation du pH). L'atrophie de type B est quant à elle très fréquemment associée à une infection par *Helicobacter pylori*. Ce tableau de gastrite chronique de type A a été décrit comme une « lésion pré-biémérienne » par plusieurs auteurs (45). La progression de la gastrite atrophique chronique à l'atrophie gastrique avec anémie est lente, s'étalant sur 20 à 30 ans voire plus (39).

#### **II.2.1.2- Microscopie**

Les biopsies gastriques révèlent un infiltrat de cellules mononucléées (plasmocytes, lymphocytes T et lymphocytes B) dans la sous muqueuse s'étendant à la lamina propria entre les glandes gastriques (46). L'extension de l'infiltrat dans la sous muqueuse s'accompagne de lésions dégénératives des cellules pariétales et des cellules principales. Une fois l'atteinte complète, il y a une réduction marquée du nombre de glandes gastriques et les cellules pariétales et principales sont remplacées par une métaplasie intestinale. Ces modifications histologiques peuvent conduire à l'apparition de lésions pré néoplasiques ou néoplasiques, expliquant le risque accru de tumeurs gastriques dans cette population, par rapport à la



population générale (35), parmi lesquelles : les polypes hyperplasiques, les tumeurs endocrines à cellules entérochromaffine-like (EC-Lomes) et l'adénocarcinome gastrique (36, 47).

## **II.2.2- Pathogénie de la gastrite autoimmune**

Le type de lésion gastrique, la présence d'autoanticorps, l'association à certaines molécules HLA, ainsi que la régression des lésions atrophiques et de l'anémie après traitements par des corticoïdes ou par azathioprine (48), suggèrent l'étiologie autoimmune de la maladie de Biermer.

L'élément clé de la pathogénicité de la gastrite autoimmune est la pompe à protons  $H^+/K^+$  ATPase exprimée à la surface des cellules pariétales (49). Les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de cette pompe à protons constituent la cible antigénique des lymphocytes T CD4 qui semblent être responsables des lésions de gastrite autoimmune et de la destruction des cellules pariétales. De plus, il a été montré un défaut fonctionnel de la population lymphoïde T dans le sang périphérique des patients atteints de la maladie de Biermer (50). Cette immunodéficiences des cellules T peut être en partie responsable d'une dysrégulation du système immunitaire et être impliquée dans la lésion gastrique des patients.

La sous unité  $\beta$  est considérée comme l'autoantigène conduisant à une réponse immunitaire humorale pathologique. Il en résulte une perte des cellules pariétales de la muqueuse gastrique avec apparition d'autoanticorps dirigés contre les cellules pariétales et contre leur produit de sécrétion, le facteur intrinsèque (39, 46). Cependant, le rôle de ces anticorps dans la genèse de la gastrite atrophique n'est pas encore clairement établi.

### **II.2.2.1- Les anticorps anti-cellules pariétales**

La cible moléculaire est la pompe à protons (ATPase  $H^+/K^+$ ) localisée dans les canalicules sécrétoires des cellules pariétales gastriques (49). Ces anticorps sont présents chez 90% des patients atteints de la maladie de Biermer. Au cours de la progression de la maladie parallèlement à la perte de la masse des cellules pariétales, l'incidence des anticorps diminue à 80% en raison probablement de la perte de l'antigène cible. Ce phénomène expliquerait la faible incidence de ces anticorps, 55%, dans une étude récente réalisée sur des patients biermériens (51). Ces anticorps sont sensibles mais manquent de spécificité puisqu'on les retrouve chez 2 à 5% des adultes sains avec une prévalence qui augmente avec l'âge, chez 30% des parents du premier degré d'un sujet ayant une maladie de Biermer (47) et chez 30 à 60 % des patients ayant seulement une atrophie gastrique. Ils sont plus à considérer comme un





marqueur de gastrite autoimmune que comme un élément diagnostique caractéristique de la maladie de Biermer, en opposition aux anticorps anti-facteur intrinsèque.

### **II.2.2.2- Les anticorps anti-facteur intrinsèque**

Le facteur intrinsèque (FI) est une glycoprotéine monocaténaire de 340 acides aminés avec 36 résidus glucidiques synthétisé par les cellules pariétales. En se fixant à la vitamine B12 (cyanocobalamine), il assure son absorption au niveau de l'iléon distal.

Il s'agit d'une molécule à haut pouvoir antigénique qui peut induire la formation d'autoanticorps dont la nature et le mode d'action sont bien connus (41).

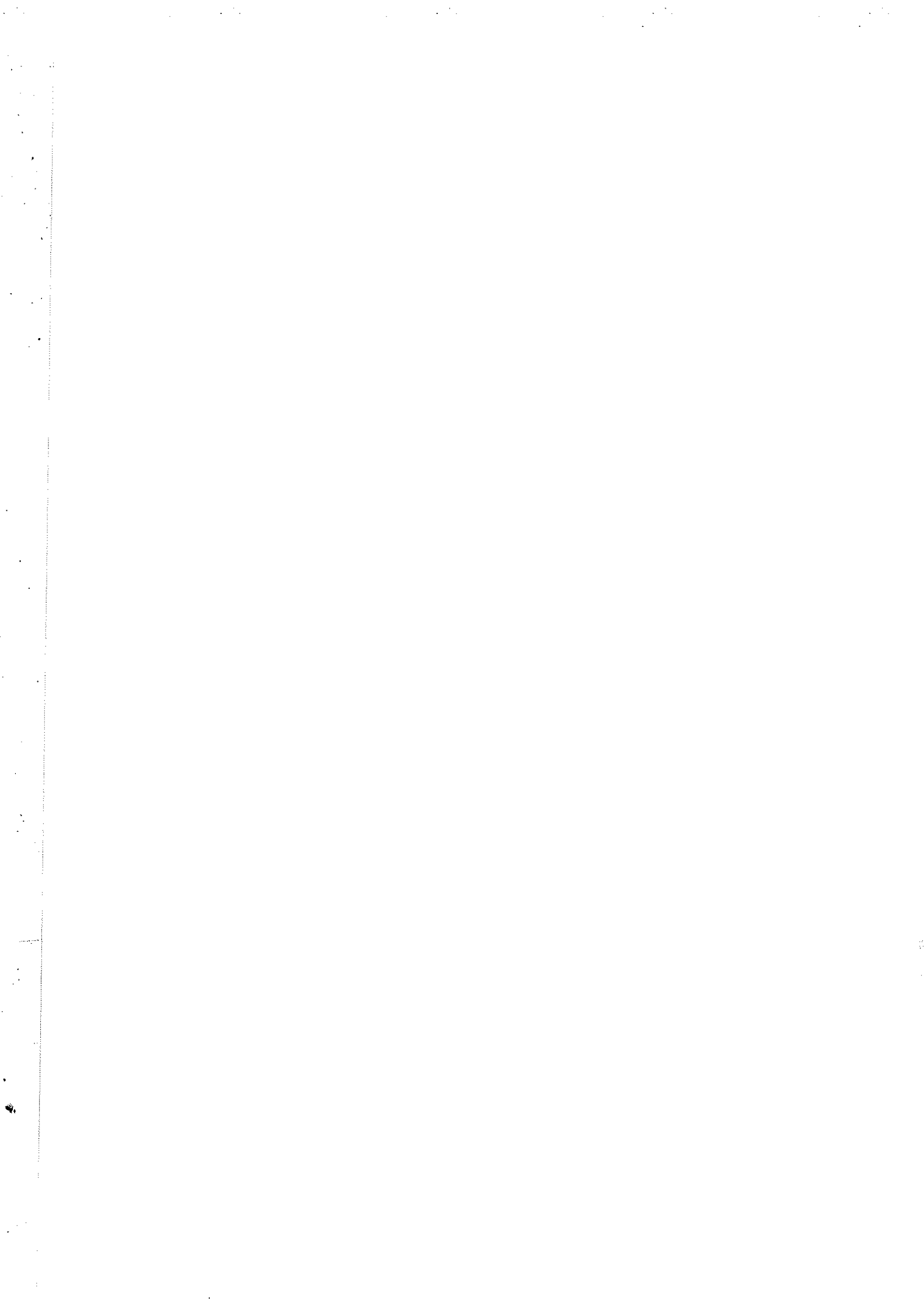
Par rapport aux anticorps anti-cellules pariétales, ces anticorps sont beaucoup plus spécifiques mais beaucoup moins sensibles (sensibilité 50%, spécificité > 98%).

Ces anticorps anti-facteur intrinsèque sont des immunoglobulines de type IgG aux chaînes légères polyclonales. Il en existe deux types qui diffèrent par leur spécificité épitopique : les anticorps de type I appelés « bloquants » et les anticorps de type II appelés « précipitants ou liants ». Les anticorps bloquants se lient au niveau du site de fixation de la vitamine B12 et bloque ainsi la formation du complexe B12-FI. L'épitope cible des autoanticorps de type I est localisé entre le 251<sup>ième</sup> et le 265<sup>ième</sup> acide aminé du facteur intrinsèque (52). Ces anticorps sont retrouvés chez 40 à 60% des sujets biermériens (35, 47). L'incidence de ces anticorps augmentant chez la femme (53) et avec l'évolution de la maladie pour atteindre 70% (39).

Les anticorps de type II se fixent à un site différent et forme un complexe ternaire B12 – FI- anticorps empêchant ainsi la fixation du complexe sur les récepteurs iléaux. Ils ne sont retrouvés que dans 30% des cas. Il semblerait que la cible antigénique des anticorps de type II soit moins immunogène que la cible antigénique des anticorps de type I. Cependant, il a été mis en évidence que ces anticorps seuls ou en association seraient plus fréquents qu'initialement rapporté (39, 54).

Ces autoanticorps sont retrouvés en général dans le sérum et peuvent même traverser le placenta et déterminer une carence en vitamine B12 chez le nouveau né (41). Ces anticorps sont retrouvés quoique plus rarement dans le suc gastrique et dans ce cas ils correspondent à des IgA mais le plus souvent il s'agit d'IgG de même nature que les anticorps sériques (41).

Leur rôle dans le développement de la maladie n'est cependant pas clairement établi. En effet ils ont été retrouvés dans de rares cas chez des patients indemnes (55) et ne se sont pas avérés être prédictifs de la maladie comme le montre l'exemple suivant. Une patiente de 44 ans présentant des titres élevés d'anticorps anti-FI a été suivie pendant 27 ans sans que la maladie ne se déclare alors que les taux d'anticorps sont restés élevés.



Au plan pathogénique, il a été montré que dans le cadre d'hépatite chronique la synthèse des anticorps anti-facteur intrinsèque et anti-cellules pariétales peut être induite par un traitement par l'INF  $\alpha$  (42).

La production de ces anticorps anti-facteur intrinsèque ainsi que la destruction des cellules pariétales, conduisent à une diminution de la synthèse du facteur intrinsèque, avec comme première conséquence une malabsorption de la vitamine B12 responsable des différentes manifestations cliniques de la maladie de Biermer.

## **II.3- La carence en vitamine B12**

### **II.3.1- Rappels sur la vitamine B12 ou cobalamine**

#### **II.3.1.1- Sources et besoins**

La vitamine B12 est le terme générique qui désigne l'ensemble des cobalamines.

La vitamine B12 est une vitamine hydrosoluble synthétisée uniquement par certains microorganismes (bactéries, levures, algues). Chez l'homme, elle est apportée par des aliments d'origine animale (abats, foie, viande, œuf, lait, fruit de mer et poisson). L'apport quotidien dans les pays développés est d'environ 5 à 15  $\mu\text{g}$  de vitamine B12, les besoins quotidiens sont estimés entre 3 et 5  $\mu\text{g}$  par jour chez l'adulte, et augmentent en période de croissance, d'état hyper métabolique, de gestation et d'allaitement maternel (56).

#### **II.3.1.2- Métabolisme de la vitamine B12**

La vitamine B12 dans les aliments n'est pas à l'état libre, mais combinée à des transporteurs protéiques. Après ingestion, la vitamine B12 liée aux protéines alimentaires arrive dans l'estomac où il se produit la libération de la cobalamine grâce à l'acidité du milieu. La cobalamine libérée se trouve en présence de deux protéines de transport, l'haptocorrine (HC) et le facteur intrinsèque. La cobalamine se combine préférentiellement à l'HC au niveau de l'estomac. L'HC est ensuite dégradée au niveau duodénal par des protéases pancréatiques, le facteur intrinsèque reste lui intact et se combine à la cobalamine, la protégeant ainsi des agressions microbiennes et enzymatiques. Le complexe vitamine B12-facteur intrinsèque transite vers l'iléon terminal, et se fixe au récepteur des microvillosités de

<b>Etapes</b>	<b>Acteurs du métabolisme</b>	<b>Etiologies</b>
<b>Apport</b>	Aliments	Végétaliens stricts
<b>Digestion</b>	Haptocorrine Sécrétions gastriques Facteur intrinsèque Sécrétions pancréatiques et biliaires	Gastrectomies Maladie de Biermer Syndrome de non dissociation de la vitamine B12 de ses protéines porteuses
<b>Absorption</b>	Facteur intrinsèque Cubuline (Ca <sup>2+</sup> )	Résections iléales Malabsorption Maladie de Biermer Maladie d'Imerslund-Gräsbeck
<b>Transport</b>	Transcobalamine	Déficits congénitaux en transcobalamine II
<b>Métabolisme intracellulaire</b>	Enzymes intracellulaires	Déficits congénitaux en divers enzymes intracellulaires

**Tableau 8** : Etapes du métabolisme et principales étiologies des carences en vitamine B12 (47).

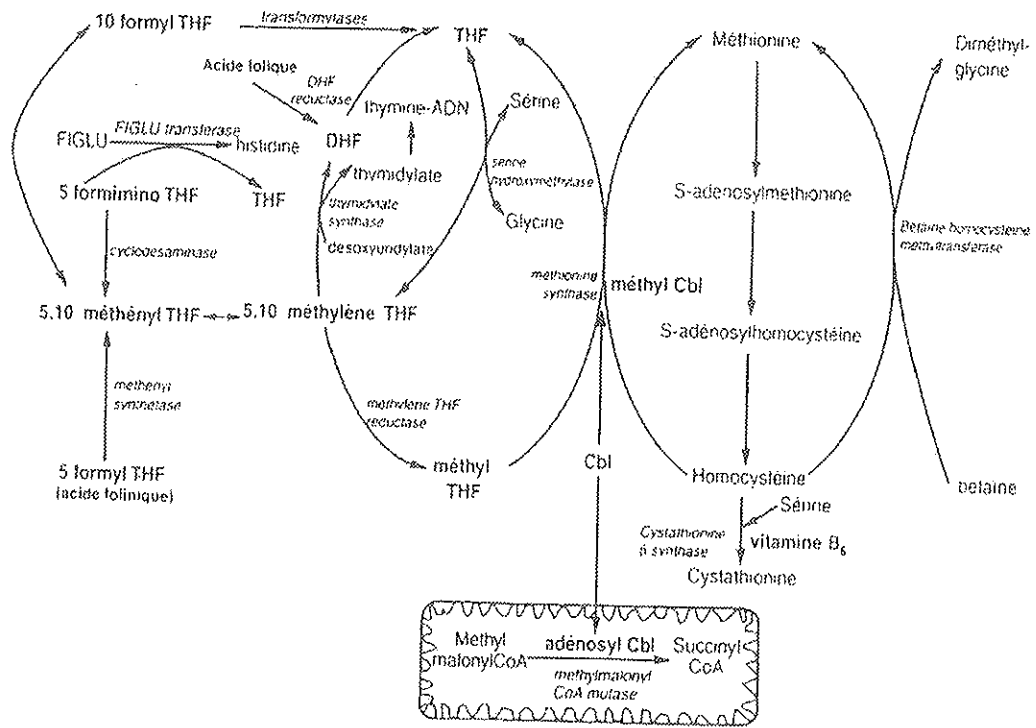
l'iléon terminal, la cubuline en présence de calcium et d'un pH supérieur à 5,6. A noter cependant que plus d' 1% de la vitamine B12 est absorbé selon un mécanisme de diffusion passive. Dans le sang, la vitamine B12 est liée à une protéine porteuse la transcobalamine II (TC II). Ce complexe se lie au niveau de différents tissus cibles où il est transporté dans les cellules par endocytose. La TC II est dégradée alors que la vitamine B12 est transformée en ses différentes formes de coenzymes : l'adénosylcobalamine et la méthylcobalamine (40, 56).

Les réserves sont importantes (plus de 1,5 mg), essentiellement hépatiques, expliquant le délai de cinq à dix ans entre l'installation d'un déficit en vitamine B12 et l'apparition de manifestations cliniques. Ce délai s'explique également par l'existence d'un cycle entérohépatique et d'une épargne réalisée par la mégaline, récepteur présent au niveau du tube contourné proximal qui permet une réabsorption quasi complète de la vitamine B12 excrétée dans les urines (47). La carence en vitamine B12 est tardive, d'une part car la réduction de la production du facteur intrinsèque est lente, nécessitant une atrophie sévère donc l'existence d'une maladie prolongée du tube digestif et d'autre part car les réserves en vitamine B12 sont importantes.

### **II.3.2- Etiologies des carences en vitamine B12**

La carence en vitamine B12 est fréquente chez l'adulte notamment chez le sujet âgé où elle touche 15 à plus de 20% des individus selon les études (42, 47). Cette carence est néanmoins souvent méconnue en raison des manifestations cliniques et/ou biologiques frustrées.

Chez l'adulte, les principales étiologies de la carence en vitamine B12 (*Tableau 8*) sont : le syndrome de non dissociation de la vitamine B12 de ses protéines porteuses dans 60% des cas du fait de la réduction de la sécrétion chlorhydropeptidique, et la maladie de Biermer dans 20% des cas par carence en facteur intrinsèque (42). Parmi les autres causes, plus rares, la carence d'apport (régime de type végétalien, personnes âgées institutionnalisées), la malabsorption digestive en cas de gastrectomies, de résections chirurgicales du grêle terminal (< 5%), de maladie de Crohn, de lymphomes, d'amyloses, de sclérodermie, de maladie de Whipple, d'infections à bothriocéphale, de déficit de la fonction exocrine du pancréas ou encore de la prise de colchicine ou de cholestyramine et enfin les carences en cobalamine des maladies métaboliques.



**Figure 9 :** Réactions métaboliques dans lesquelles sont impliquées les coenzymes foliques et cobalaminiques associées aux enzymes correspondantes. Cbl : cobalamines ; THF : tétrahydrofolate ; DHF : dihydrofolate (58).

### **II.3.3- Rôle de la vitamine B12**

Chez l'homme, l'adényl- et la méthylcobalamine sont des coenzymes indispensables à la régulation de la division cellulaire et à l'intégrité du fonctionnement du système nerveux.

L'adénylcobalamine, par réaction de transfert d'hydrogène intervient dans la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA. En cas de carence il y a une augmentation du méthylmalonyl-CoA qui est sécrété dans les urines sous forme d'acide méthylmalonique (*Figure 9*).

La méthylcobalamine est un facteur coenzymatique d'une méthyltransférase intervenant dans la réaction de méthylation de l'homocystéine en méthionine. Cette réaction permet la régénération du tétrahydrofolate à partir du méthyltétrahydrofolate. Un déficit en méthylcobalamine conduit (56) :

- à l'accumulation de l'homocystéine, excrétée dans les urines. Cette accumulation a été évoquée pour expliquer les troubles neurologiques observés dans la maladie de Biermer (57) ;
- au défaut de régénération d'un des coenzymes de la thymidylate synthétase (le méthylène tétrahydrofolate) responsable du blocage de la conversion du dUMP (désoxyuridylate) en dTMP (désoxythymidylate) et donc de la synthèse de l'ADN entraînant un trouble de la division cellulaire. Cette anomalie affecte tout particulièrement les tissus à renouvellement rapide : tissu hématopoïétique, cellules de la muqueuse digestive et vaginale (35).

### **II.4- Manifestations cliniques de la maladie de Biermer**

Les manifestations cliniques sont celles d'une carence en vitamine B12. Elles sont extrêmement polymorphes et de gravité variable, dominées principalement par des troubles hématologiques et neurologiques (cf page suivante). Ce tableau clinique classique s'est enrichi récemment de nouveaux signes cliniques : gynécologiques et vasculaires (47).

## Principales manifestations cliniques des carences en vitamine B12

d'après (47)

### **Manifestations hématologiques**

- fréquentes : macrocytose, hypersegmentation des polynucléaires neutrophiles, anémies macrocytaires arégénératives, mégaloblastose médullaire « moelle bleue »
- rares : thrombopénie et neutropénie isolées, pancytopénie
- exceptionnelles : anémie hémolytique, tableau de pseudomicroangiopathie thrombotique

### **Manifestations neuropsychiatriques**

- fréquentes : polynévrites (surtout sensitives), ataxie, signe de Babinski
- classiques : sclérose combinée de la moelle
- rares : syndrome cérébelleux, atteinte des nerfs crâniens dont névrites optiques, atrophie optique
- en cours d'étude : altérations des fonctions supérieures voire démences, accidents vasculaires et athérosclérose (hyperhomocystéine), syndromes parkinsoniens, dépression, troubles du sommeil

### **Manifestations digestives**

- classiques : glossite de Hunter, ictère et élévation des LDH et de la bilirubine (« avortement intramedullaire »)
- liens discutables : douleurs abdominales, dyspepsies, nausées, vomissements, diarrhées, troubles fonctionnels intestinaux
- rares : ulcères cutanéomuqueux rebelles et/ ou récidivants

### **Manifestations gynéco-obstétriques**

- discutables : atrophie de la muqueuse vaginale et infections chroniques vaginales (surtout mycoses) et/ ou urinaires
- en cours d'étude : hypofertilité et avortements à répétition

### **Autres**

- en cours d'étude : maladies thromboemboliques veineuses et cardiopathies ischémiques via hyperhomocystéinémie.



## **II.5- Diagnostic de la maladie de Biermer**

Le diagnostic de cette pathologie est délicat en raison de la présence de signes inconstants et de la disparition du test de Schilling depuis janvier 2001 en raison du risque de transmission de la maladie de Creutzfeld-Jacob. L'établissement du diagnostic se fait en deux étapes, tout d'abord l'affirmation de la carence en vitamine B12 puis le diagnostic étiologique de ce déficit vitaminique.

### **II.5.1- Diagnostic de la carence en vitamine B12**

#### **II.5.1.1- Signes hématologiques d'une anémie mégalo-blastique**

##### *a- L'hémogramme (35, 57, 58)*

Il existe une anémie (parfois profonde avec un taux d'hémoglobine inférieur à 4 g/dl, voire moins), macrocytaire, normochrome et arégénérative. Le volume globulaire moyen (VGM) est supérieur à 100 fl pouvant atteindre 130 voire 140 fl. Les autres lignées sanguines sont souvent diminuées : leuconéutropénie, thrombocytopénie modérée voire lymphopénie, réalisant souvent un tableau de pancytopénie.

##### *b- Le frottis (35, 58).*

L'examen du frottis sanguin montre des anomalies morphologiques portant sur les trois lignées. On note la présence de macro-ovalocytes, d'une polychromatophilie des hématies, de nombreux corps de Jolly, de ponctuations basophiles. Ces anomalies érythrocytaires sont évocatrices d'une dysérythropoïèse. En cas d'anémie sévère, on note aussi une schizocytose importante et, dans ce cas, le VGM est souvent normal. Les polynucléaires sont de grandes tailles, avec un pourcentage variable ( $\geq 5\%$ ) de noyaux hypersegmentés à 5 lobes ou plus. Cette hypersegmentation est la première anomalie à apparaître et présente une grande valeur diagnostique. Les plaquettes sont souvent géantes.

##### *c- Le myélogramme (35, 58)*

La moelle est riche et intensément bleue du fait de la basophilie du cytoplasme des érythroblastes qui sont en pourcentage accru. Cette érythroblastose, contrastant avec l'absence d'hyper-réticulocytose, témoigne de l'érythropoïèse inefficace. Ces érythroblastes sont le plus souvent géants, d'où le nom de mégalo-blastose. Ils présentent un asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique, avec des noyaux jeunes à chromatine fine perlée,



contrastant avec un cytoplasme à maturation normale. Les autres lignées sont aussi affectées : métamyélocytes géants avec noyaux en fer à cheval, mégacaryocytes polylobés.

### **II.5.1.2- Signes biochimiques**

#### *a- Le bilan d'hémolyse*

Du fait de l'érythropoïèse inefficace observée dans les anémies mégalo-blastiques et de l'hémolyse intra-médullaire qui en résulte, on peut assister à une augmentation des valeurs sériques de la bilirubine, de l'activité de la LDH et à une chute de l'haptoglobine, dépendante de la sévérité de l'anémie.

#### *b- Dosage de la vitamine B12*

Les premières techniques de dosage étaient des techniques microbiologiques. Elles consistaient à quantifier la croissance de microorganismes auxotrophes pour la vitamine B12 (souches de *Lactobacillus leishmanii*) par néphélométrie ou titrage potentiométrique (59). Cette technique fut longtemps considérée comme une méthode de référence en raison de sa sensibilité et de sa fiabilité. Compte tenu de la difficulté et de la longueur (délai d'obtention des résultats de 2 à 3 jours) de cette méthode, elle est aujourd'hui abandonnée au profit de techniques immunologiques par compétition plus rapides et souvent automatisées : techniques radioimmunologiques, immunoenzymatiques ou de chimiluminescence (60). Ces méthodes de dosage plus récentes présentent comme inconvénient de donner habituellement des intervalles de référence trop larges risquant de ne pas mettre en évidence les déficits modérés.

Les concentrations en vitamine B12, considérées comme normales sont variables selon les techniques utilisées. Selon l'étude strasbourgeoise (42), les valeurs normales sont comprises entre 200 et 1100 pg/ml, elles ont été déterminées à l'aide du kit Radio Immuno Assay, Bayer Corp.

On admet comme anormalement bas et traduisant une carence avec une sensibilité de 97%, les chiffres inférieurs à 200 pg/ml soit 148 pmol/l (1 pmol = 1 ng x 0,738). Au dessus de 300 pg/ml la carence est peu vraisemblable, entre 200 et 300 pg/ml elle est possible.

En cas de maladie de Biermer, le taux de vitamine B12 est normalement abaissé, même dans le cas où les anomalies hématologiques sont discrètes. Cependant, un certain temps est nécessaire avant l'apparition de cette carence, signe de malabsorption puisqu'il faut que la muqueuse gastrique soit bien atrophiée et que les réserves soient épuisées.

	Carence en folates	Carence en vitamine B12
Folates sériques	↓↓	N ou ↑
Folates érythrocytaires	↓↓	↓
Vitamine B12	N	↓↓
Homocystéine sérique	↑	↑↑
Acide méthylmalonique sérique	N	↑↑
Billirubine sérique libre	↑	↑
Lactico-déshydrogénase	↑	↑↑

N : normal, ↑ : augmenté, ↓ : diminué.

**Tableau 9 :** Tests de diagnostic des carences en vitamine B12 et en folates (35).

### *c- Dosages des folates sériques et érythrocytaires*

Les dosages sériques et érythrocytaires des folates trouvent leurs indications dans la démarche diagnostique d'un tableau compatible avec une carence vitaminique pour deux raisons (35, 60).

Tout d'abord, le déficit en folates est un diagnostic différentiel de la carence en B12 dans le cadre du bilan d'une anémie mégaloblastique (*Tableau 9*).

Ensuite le bilan folique a classiquement un profil particulier dans les déficits en B12. Le taux des folates sériques est normal voire augmenté (piège des méthylfolates et, libération des folates érythrocytaires secondaire à la lyse des précurseurs érythroïdes) et celui des folates érythrocytaires est diminué (défaut de rétention cellulaire des folates en raison de la carence en vitamine B12).

Tout comme pour la vitamine B12, les premières techniques utilisées étaient des techniques microbiologiques. Elles sont maintenant complètement abandonnées au profit des techniques immunologiques par compétition.

### *d- Dosages de deux métabolites: homocystéine et acide méthylmalonique*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'absence de formes actives de la vitamine B12, méthylcobalamine et adénosylcobalamine est responsable de l'accumulation d'homocystéine et d'acide méthylmalonique (*Tableau 9*). L'élévation du taux d'homocystéine et d'acide méthylmalonique plasmatiques est un marqueur précoce de la carence en vitamine B12 mais non spécifique en raison de leur augmentation dans l'insuffisance rénale, dans d'autres déficits vitaminiques (vitamine B6, folates mais à un niveau moindre) et dans certaines maladies métaboliques (mutation de la MTHFR réductase). Ces dosages ne sont cependant pas réalisés en routine.

### *e- Test de dU suppression*

Il s'effectue sur des cellules médullaires obtenues par ponction de moelle, dans des laboratoires spécialisés, et à l'avantage de donner le statut vitaminique du patient en 24 heures. Il consiste à mesurer radioisotopiquement l'incorporation de la thymidine tritiée par les cellules médullaires. Celle-ci est faible voire nulle chez les sujets normaux alors qu'elle est augmentée chez les patients atteints d'une carence en vitamine B12 ou en folates en raison du blocage de la conversion du désoxyuridylate en thymidylate. L'addition de la vitamine carentielle corrige le test (57).



## II.5.2- Diagnostic étiologique du déficit en vitamine B12

### II.5.2.1- Mise en évidence de la gastrite fundique

#### *a- Méthode directe : fibroscopie gastroduodénale et biopsies gastriques*

La fibroscopie gastrique associée à des biopsies de la muqueuse révèle l'aspect atrophique du fundus. Des anomalies histologiques sont observées, telles qu'une infiltration lymphoplasmocytaire. Les tubules sécrétoires des cellules pariétales sont remplacés par des cellules muqueuses de type intestinal (métaplasies intestinales fundiques).

#### *b- Méthodes indirectes*

- Pepsinogène I et II

L'activité du pepsinogène est diminuée dans la maladie de Biermer comme dans toutes les atrophies gastriques. Cette diminution est prépondérante sur le pepsinogène I (PG I), le principal pepsinogène circulant, et est secondaire à la perte des cellules principales. A l'inverse, le pepsinogène II (PG II) est peu diminué du fait de l'intégrité de la muqueuse pylorique qui est, avec la muqueuse fundique, la deuxième source de pepsinogène II. Ainsi une diminution du rapport PG I/ PG II est caractéristique des gastrites dites A, comme celles décrites dans la maladie de Biermer (46, 60).

- La gastrinémie

Une élévation de la gastrinémie est le reflet de la stimulation permanente de l'antra par l'achlorhydrie. La gastrine est physiologiquement sécrétée par la muqueuse de l'antra. Elle stimule par voie sanguine, les cellules du fundus conduisant à la sécrétion chlorhydropeptidique. En retour, l'acidité du suc gastrique freine la production de gastrine. Ainsi dans la maladie de Biermer, l'absence de rétrocontrôle négatif de la sécrétion acide sur les cellules à gastrine, du fait d'une gastrite de type A, est responsable de l'hypergastrinémie (61). Bien que très sensible, l'inclusion de la gastrinémie dans la démarche diagnostique d'une maladie de Biermer trouve une opposition dans sa très faible spécificité. En effet la gastrinémie peut être augmentée dans des affections rares comme le syndrome de Zollinger-Ellison, d'autres plus fréquentes comme l'insuffisance rénale, le vieillissement, la prise d'inhibiteurs de la pompe à protons, l'infection à *Helicobacter pylori*. Dans ces derniers cas, l'augmentation de la gastrinémie est très modérée par rapport à celle rencontrée dans la maladie de Biermer ou le syndrome de Zollinger (taux de gastrine jusqu'à 100 fois la valeur seuil) (60).





- Achlorhydrie pentagastrino-résistante

Ce test est basé sur la stimulation de la sécrétion d'acide chlorhydrique, de pepsine et de facteur intrinsèque par la pentagastrine qui a une action similaire à la gastrine naturelle.

Dans la maladie de Biermer, l'achlorhydrie est pentagastrino-résistante (60).

### **II.5.2.2- Le test de Schilling**

Au début des années 50, le test de Schilling fut considéré comme l'examen de référence pour le diagnostic de la maladie de Biermer. Le test de Schilling classique consiste après saturation de l'organisme par 2000 µg de vitamine B12 intramusculaire à administrer par voie orale 0,5 à 2 µg de cyanocobalamine marquée au cobalt 57 et à mesurer la radioactivité urinaire des 48 heures suivant l'ingestion. Chez le sujet normal, plus de 10% de la radioactivité ingérée sont éliminés dans les urines de 48 heures. Le test est renouvelé 15 jours plus tard avec ingestion concomitante de facteur intrinsèque (d'origine porcine) en excès. Une normalisation du test de Schilling obtenue au cours de cette seconde épreuve est en faveur de la malabsorption par carence en FI (40).

Une variante de ce test a été proposée associant la prise orale de vitamine B12 libre marquée au cobalt 58 à celle de vitamine B12 marquée au cobalt 57 et liée au FI. Ce test en s'appuyant sur un rapport d'excrétion permet de s'affranchir des anomalies de recueil ou de filtration rénale, mais présente comme inconvénient la possibilité d'échange du FI entre les deux isotopes pouvant donner des résultats contradictoires (60).

Malgré les difficultés de réalisation et d'interprétation de cet examen, et son coût élevé (140 euros), le test de Schilling est longtemps resté un examen décisif dans le diagnostic de la maladie de Biermer jusqu'à janvier 2001 en raison du risque de transmission de la maladie de Creutzfeld-Jacob.

Sa disparition laisse donc supposer que la validation d'un nouvel examen spécifique de la maladie trouverait rapidement une place dans la conduite diagnostique.



### II.5.2.3- Diagnostic biologique étiologique

#### *a- Dosage gastrique du facteur intrinsèque*

L'absence de FI dans les sécrétions gastriques est caractéristique de la maladie de Biermer puisque cela correspond à l'expression physiologique de l'absence de cellules pariétales sécrétantes. Son dosage par réalisation d'un tubage gastrique, peut être faussé par la présence conjointe dans l'estomac d'anticorps anti-FI si l'on ne procède pas à une dissociation et à une dénaturation préalable de ces autoanticorps (60). Mais, malgré l'association d'une sensibilité et d'une spécificité proches de 100%, cet examen peut difficilement apparaître comme un dépistage de la maladie de Biermer chez tous les patients suspects par son caractère désagréable, et par sa réalisation dans un nombre restreint de laboratoire (CHU de Nancy).

#### *b- Diagnostic immunologique*

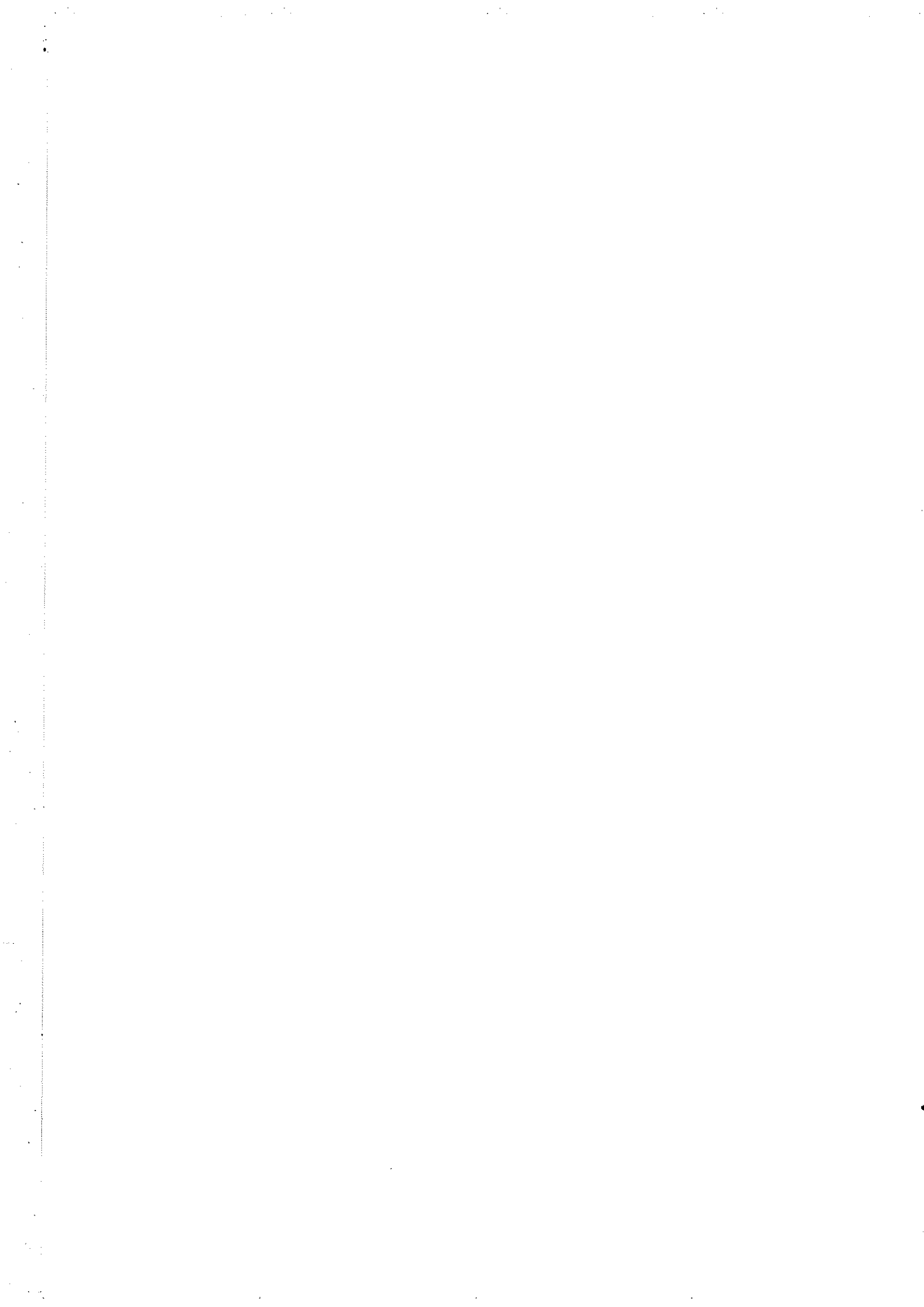
La présence d'autoanticorps dirigés contre le FI et les cellules pariétales gastriques, reflète le caractère immunologique de la maladie de Biermer.

- Les anticorps anti-cellules pariétales

Comme vu précédemment, ces anticorps sont dirigés contre la pompe à protons localisée dans les canalicules sécrétoires des cellules pariétales et dans les microsomes gastriques. Ils sont dosés par immunofluorescence indirecte sur coupe d'estomac de souris (46) ou par des techniques ELISA.

Ces anticorps sont sensibles et présents chez 80 à 90% des patients présentant une maladie de Biermer (35, 39, 46). Pour les 10 à 20% des patients restant qui ne présentent pas ces anticorps plusieurs hypothèses ont été avancées (46) :

- un diagnostic erroné ;
- une liaison complète entre anticorps et antigène de telle façon qu'il n'existe plus d'anticorps circulant au moment de la mesure ;
- une disparition de l'anticorps en raison de la disparition ou du manque de production de l'antigène ;
- des mesures de l'anticorps insuffisamment sensibles pour tous les patients ;
- une diminution jusqu'au point de non détection des anticorps sériques, consécutivement à une altération de la structure antigénique de la muqueuse gastrique ;
- une hétérogénéité pathogénique.



Selon Toh (39), ces anticorps témoignent de la lésion gastrique, cependant il n'a pas été encore montré qu'il existait un lien entre le taux d'anticorps et la sévérité de l'atteinte de la muqueuse gastrique. La présence des anticorps anti-cellules pariétales est indépendante de la présence ou de l'absence des anticorps anti- facteur intrinsèque (60).

- Les anticorps anti-FI

Ces anticorps contrairement aux anticorps anti-cellules pariétales, ont une valeur diagnostique considérable du fait de leur grande spécificité (35, 47).

Comme vu ci-dessus il existe deux types d'anticorps anti-FI : les anticorps de type I bloquants les plus fréquents (chez 40 à 60% des sujets biermériens) et les anticorps de type II précipitants (chez 30% des sujets biermériens). Dans le sérum de patients biermériens, on peut retrouver simultanément les deux types d'anticorps ou uniquement les anticorps de type I ou les anticorps de type II. La concentration des anticorps bloquants semble significativement plus haute dans le sérum de patients contenant également des anticorps précipitants que dans le sérum de patients ne contenant que les anticorps bloquants.

Actuellement, la méthode de choix pour la détection des anticorps anti-FI est la RIA, utilisant la vitamine B12 marquée au cobalt 58. Il s'agit d'une technique quantitative ne détectant que les anticorps de type I (62). Basée sur la technique d'Aderman et Chanarin (63), cette technique permet de démontrer la présence d'anticorps inhibant la combinaison du facteur intrinsèque à la vitamine B12. Pour cela la vitamine B12 marquée au cobalt 58 est additionnée à un mélange initial : sérum à tester + suc gastrique préalablement titré en facteur intrinsèque. La présence d'anticorps anti-facteur intrinsèque empêche la liaison du facteur intrinsèque à la vitamine B12 radiomarquée qui reste donc libre. Elle est ensuite adsorbée par de l'albumine et du charbon actif. La radioactivité de ce dernier est donc proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-facteur intrinsèque présents dans le sérum du malade. Les inconvénients majeurs de cette technique, outre l'utilisation de radioéléments, sont sa complexité puisqu'elle nécessite l'obtention de suc gastrique préalablement titré en facteur intrinsèque, son incapacité à détecter les anticorps de type II et les faux positifs en cas de concentration en vitamine B12 élevée (apport de vitamine B12 exogène) (64).

L'autre méthode utilisée est l'ELISA, qualitative, elle détecte les anticorps de type I et de type II sans que des concentrations élevées en vitamine B12 puissent interférer (65). Il s'agit de méthodes de dosage en phase solide basée sur le principe du « sandwich ». Les sérums sont distribués dans des barrettes sensibilisées avec du facteur intrinsèque dont l'origine varie suivant les trousse de dosage utilisées (origine porcine, recombinant humain). Un anticorps



anti-IgG humaine couplée à une enzyme (peroxydase) est ajouté. La révélation s'effectue après ajout du substrat. L'intensité de la coloration (DO) est proportionnelle à la concentration des anticorps anti-FI. Ces techniques détectant les deux spécificités d'anticorps sont à privilégier si on prend en compte la fréquence plus élevée qu'initialement rapporté des anticorps de type II (54). Récemment le dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque de type I a été adapté sur un automate de chimiluminescence développé par la société Beckman Coulter (66).

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons comparé cette dernière technique de dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque reposant sur une méthode par compétition à trois méthodes ELISA dont celle utilisée en routine au laboratoire.

### **II.5.3- Problèmes diagnostiques**

Les examens utilisés pour rechercher une maladie de Biermer sont nombreux mais pour la plupart ne permettent qu'une orientation vers une carence vitaminique. L'étiologie est plus difficile à établir, surtout depuis l'abandon du test de Schilling en raison du risque infectieux. La disparition de ce test pose le problème des examens à envisager pour une approche diagnostique la moins invasive possible.

Le problème des critères formels de diagnostic de cette pathologie (dont beaucoup de signes sont inconstants) perdure (40). Cette difficulté est mise en évidence lorsqu'on observe les critères d'inclusion, parfois nombreux et fantaisistes, des patients inclus dans les études scientifiques sur la maladie de Biermer.

Le seul signe spécifique est donné par un examen actuellement réputé agressif et qui exige un laboratoire compétent : le tubage gastrique afin de mesurer le débit horaire de facteur intrinsèque (40).

En l'absence de consensus, le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments, variable selon les auteurs.

Selon D. Cattan (40), le diagnostic de la maladie peut-être posé avec certitude en présence d'anticorps anti-FI sérique et d'une hypergastrinémie associée. L'absence de ces deux signes ou de l'un d'entre eux n'élimine pas le diagnostic. Le remplacement de l'hypergastrinémie par l'atrophie fundique est admissible, cependant la gastrite atrophique seule et l'hypergastrinémie seule ne suffisent pas.

Selon D. Cadiot (36), gastroentérologue à l'hôpital de Reims, les arguments diagnostiques sont les suivants :





- une gastrite atrophique limitée au fundus sans autres causes, notamment d'infection à *Helicobacter pylori* ;

- une spécificité anatomopathologique, notamment l'infiltrat inflammatoire à cellules mononuclées ;

- des signes d'autoimmunité : autres maladies autoimmunes associées notamment diabète de type I ou affections thyroïdiennes autoimmunes, présence d'anticorps anti-facteur intrinsèque ou d'anticorps anti-cellules pariétales.

Ces arguments ayant d'autant plus de poids qu'ils s'inscrivent dans un contexte :

- de carence en vitamine B12 avec ou sans anémie macrocytaire mégalo-blastique ;
- de carence martiale avec ou sans anémie microcytaire (malabsorption en raison de l'achlorhydrie) ;
- d'hypergastrinémie ;
- de polypes et de tumeurs gastriques

## **II.6- Traitement et surveillance**

Le traitement des carences en vitamine B12 repose classiquement sur l'administration parentérale de cette vitamine sous forme de cyanocobalamine. Le schéma préconisé repose sur l'injection de vitamine B12 en intramusculaire, l'administration par voie parentérale étant exceptionnelle (risque allergique). Afin de recharger rapidement les stocks tissulaires vitaminiques et de corriger l'hypovitaminose B12 sérique, l'administration de 1000 µg par jour pendant une semaine, puis 1000 µg par semaine pendant un mois, puis une injection de la même dose mensuelle à vie, est recommandée en France (47).

Il est recommandé de façon consensuelle, d'effectuer une surveillance endoscopique avec biopsies tous les 3 à 5 ans à la recherche d'une néoplasie gastrique, puisque le risque de développer un adénocarcinome chez les patients atteints de la maladie de Biermer est multiplié par 3 et celui de développer une tumeur carcinoïde par 13 (42).



**EVALUATION D'UN AUTOMATE  
MULTIPARAMETRIQUE  
APPLICATION A L'ETUDE DE L'ASSOCIATION  
DYSIMMUNITE THYROIDIENNE-DYSIMMUNITE  
GASTRIQUE**



Un automate multiparamétrique de chimiluminescence, l'UniCel DxI 800® récemment mis sur le marché par la société Beckman Coulter a été mis à notre disposition dans le laboratoire de mai à août 2006.

L'UniCel DxI 800® (DxI®) est un automate caractérisé par sa grande productivité et par la diversité des paramètres disponibles à bord relevant de disciplines aussi variées que l'hématologie, l'infectiologie, l'oncologie ou l'endocrinologie. Dans le but d'améliorer les performances du DxI®, de nouveaux dosages ont récemment été mis au point : le dosage des anticorps anti-thyroïdiens permettant de confirmer l'étiologie autoimmune des pathologies thyroïdiennes et le dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque devenu un élément décisif dans le diagnostic de la maladie de Biermer depuis la disparition du test de Schilling.

Accéder à l'automatisation complète d'un immunodosage au sein d'un système multiparamétrique comme le DxI® présente de multiples avantages en terme de rapidité, de qualité et de praticabilité. Cependant cette démarche nécessite l'appréciation des performances analytiques et de la valeur clinique des dosages concernés.

Dans cet objectif, nous avons réalisé une étude analytique portant sur l'évaluation des paramètres du bilan biologique thyroïdien et des anticorps anti-facteur intrinsèque.

Nous avons comparé les résultats des dosages de la TSH, la T4I, la T3I, des anticorps anti-TPO et anti-Tg obtenus avec le DxI® à ceux obtenus avec les techniques radioimmunologiques utilisées en routine au laboratoire, et les résultats des dosages des anticorps anti-facteur intrinsèque sur le DxI® à ceux de trois techniques ELISA dont celle utilisée en routine au laboratoire.

Les anticorps anti-facteur intrinsèque étant classiquement présents chez des patients déjà porteurs de pathologies autoimmunes notamment thyroïdiennes (35, 41), nous avons dans une deuxième partie réalisé une étude clinicobiologique rétrospective afin d'apprécier l'association dysimmunité thyroïdienne/maladie de Biermer chez les patients dont les dosages avaient été réalisés sur l'automate.



## **I- PRESENTATION DE L'AUTOMATE : L'UniCel DXI® 800**

### **I.1- Rappel sur la chimiluminescence**

L'UniCel DxI 800® est un automate multiparamétrique d'immunoanalyse utilisant le principe de chimiluminescence.

L'énergie d'une molécule est la somme de 3 énergies (67) :

- l'énergie de rotation liée aux mouvements de rotation de la molécule autour de son centre d'inertie :  $E_r$  ;
- l'énergie de vibration des atomes les uns par rapport aux autres :  $E_v$  ;
- l'énergie électronique qui dépend de la répartition des électrons au sein de la molécule :  $E_e$ .

$E_r$ ,  $E_v$ , et  $E_e$  sont quantifiées et leur variation est discontinue.

Lorsqu'une molécule absorbe suffisamment d'énergie, elle peut passer sur un niveau d'énergie (électronique, vibrationnelle et rotationnelle) supérieur (niveau excité) et revient spontanément à son niveau d'énergie fondamentale. Ce retour peut se faire avec émission de photons du domaine optique : ceci constitue le phénomène de luminescence (67).

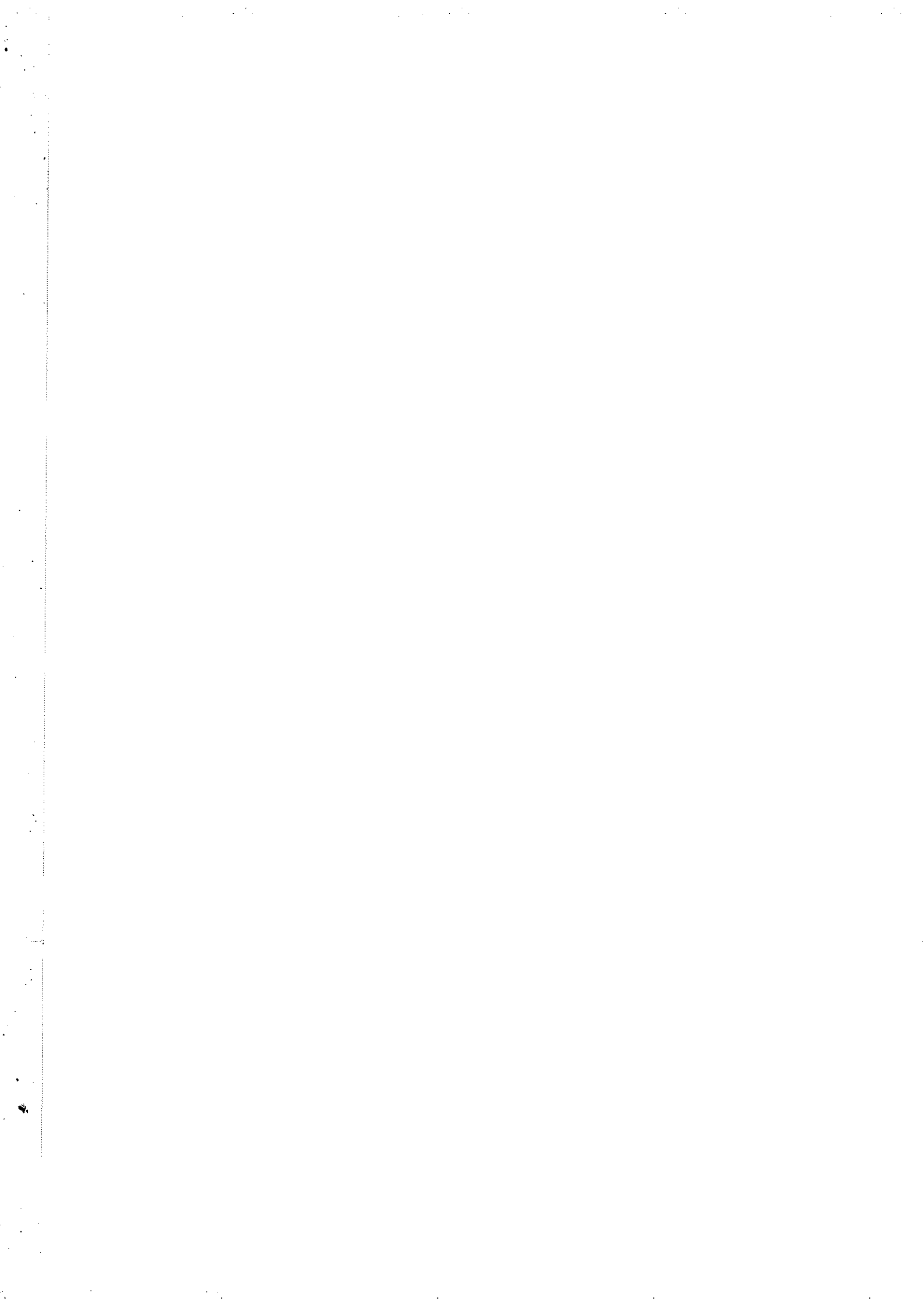
Il existe différents types de luminescence selon la nature d'excitation d'une part et le mode de désexcitation d'autre part (67).

La photoluminescence, qui englobe la fluorescence et la phosphorescence, est un phénomène d'émission consécutif à une excitation lumineuse (photons UV, visibles).

La chimiluminescence est un phénomène radiatif consécutif à une réaction chimique produisant une molécule dans un état excité.

### **I.2- L'UniCel DxI 800 ®**

L'UniCel DxI 800 ® est le dernier né de la famille des immunoanalyseurs commercialisés par la société Beckman Coulter. Il s'agit d'un système de grande productivité basé sur un concept novateur d'aliquotage de l'échantillon libérant rapidement le tube pour d'autres analyses. Cette productivité est améliorée grâce à un système de cadence du système pouvant atteindre jusqu'à 400 tests/heure. Une capacité de chargement de 50 packs de réactifs à bord





ainsi que de grands volumes de consommables assurent une autonomie importante du système (68). Cet automate repose sur une technologie de chimiluminescence indirecte utilisant comme support solide des particules magnétiques séparables par aimantation, comme marqueur enzymatique la phosphatase alcaline, et comme substrat chimiluminescent le phosphate dioxétane : Lumi-Phos 530®. Le signal constitué par une émission lumineuse continue autorise une lecture cinétique (68).

La chimiluminescence permet d'atteindre une excellente sensibilité, offre un substrat stable, permet de mesurer des substances de nature très différente, offre une bonne reproductibilité par la précision de la mesure, offre des facilités d'utilisation par innocuité des déchets.

La flexibilité des protocoles –une ou deux étapes, temps d'incubation variable- permet l'adaptation de nombreux immunodosages dans le domaine de l'endocrinologie (cortisol, FSH, LH, progestérone,  $\beta$  HCG, T3I, T4I, TSH, Tg, anti-Tg, anti-TPO), de l'hématologie (ferritine, folates, anticorps anti-FI, vitamine B12), de la cancérologie (AFP, PSA, ACE), de l'infectiologie (sérologie chlamydia, hépatite A et C, HIV, toxoplasmose) et autres (théophylline, insuline, IgE).

Les caractéristiques de l'instrument et son fonctionnement sont décrits brièvement (68) :

- le *module chargement échantillons* accepte des tubes primaires ou des cupules spéciales. Le volume minimal recommandé est de 500  $\mu$ l de sérum, les prises d'essai variant de 10 à 110  $\mu$ l selon l'analyse ;
- le *module réactifs réfrigérés* à + 4°C, peut recevoir jusqu'à 50 packs de réactifs contenant chacun 50 tests. Ces packs de réactifs sont prêts à l'emploi, identifiés par des code-barres, et doivent être bien agités par retournement avant leurs chargements dans l'appareil. Les packs de réactifs se conservent à + 4°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. Une fois ouvert, le pack est valable 14 à 56 jours selon le test ;
- le prélèvement des échantillons est assuré par une *aiguille* détectant le niveau de sérum par radiofréquence, et une éventuelle obstruction grâce à un capteur de pression. Le prélèvement des réactifs est assuré par quatre pipeteurs indépendants équipés d'un système d'ultrasons permettant une détection de niveau et une remise en suspension des particules dans le pack réactif avant chaque prélèvement ;



- la réaction a lieu dans les *cuvettes*, stockées dans l'appareil (capacité de stockage de 2000 cuvettes) avec une autonomie de 288 dosages. Après analyse, les cuvettes usagées sont recueillies dans le sac à déchets ;
- les *compartiments échantillons, réactifs, cuvettes, tampon, sac à déchets*, sont tous accessibles en continu et peuvent être rechargés ou renouvelés en cours d'analyse;
- la *phase solide* est lavée trois fois entre chaque étape réactionnelle ;
- pendant l'incubation avec le substrat, la *phosphatase alcaline* retenue sur les microparticules réalise une déphosphorylation du substrat avec libération de lumière. Le signal luminescent produit par la réaction est mesuré dans le module analytique par le luminomètre, son intensité exprimée en RLU (unités relatives de luminescence) est proportionnelle ou inversement proportionnelle selon le principe de la réaction à la concentration de la substance analysée ;
- l'équipement informatique permet la gestion des listes de travail, des réactifs (enregistrement, nombre de tests disponibles, péremption), des calibrations (stables de 14 à 56 jours en fonction du type de calibration), du contrôle de qualité (enregistrement, alarmes, représentations graphiques), des résultats (premiers résultats en 12 minutes à 1 h 10), et de la maintenance.

## **II- METHODES STATISTIQUES**

Les relations entre les valeurs dosées avec les différentes techniques ont été étudiées par régression linéaire simple.

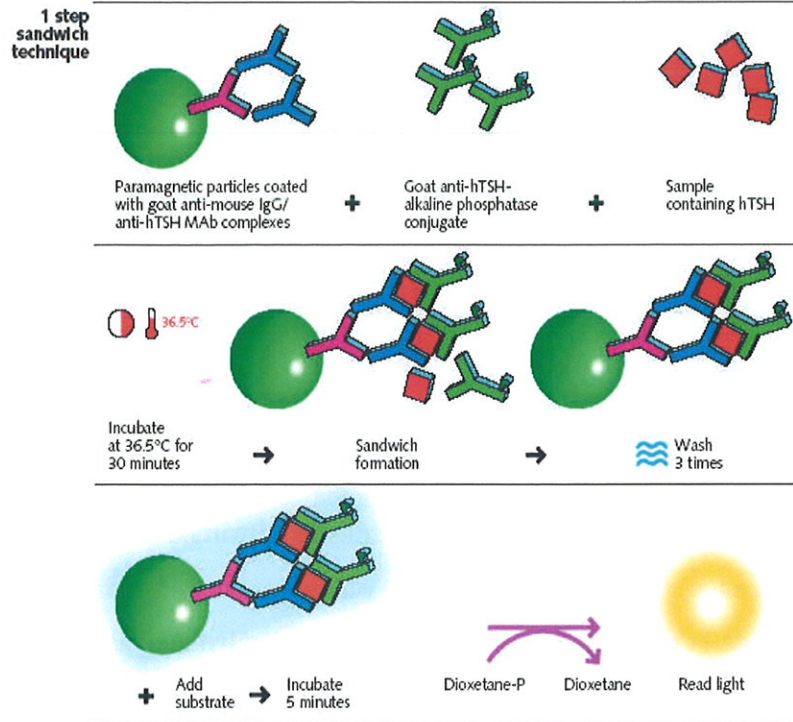
Les différences entre les valeurs de TSH, de T4I et de T3I avec les deux techniques sont représentées graphiquement selon le diagramme de Bland Altman en valeurs absolues et valeurs relatives.

La comparaison des proportions entre les différents groupes étudiés a été réalisée par un test de  $\chi^2$ .

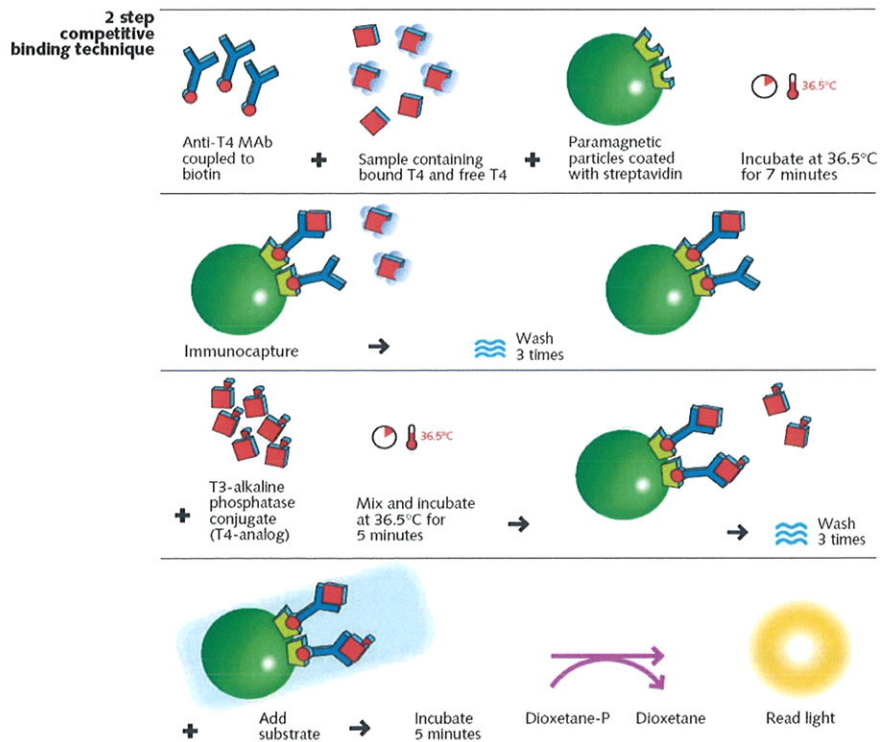
La concordance de la classification diagnostique des patients pour le dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque a été réalisée par un test « inter rater agreement ».

La comparaison des valeurs biologiques entre les différents groupes de l'étude clinicobiologique a été réalisée par un test de Mann-Whitney.

Les programmes informatiques utilisés étaient Excel 97 (Microsoft), Statview (SAS institute V5), Med Calc (V9).



**Figure 10** : Principe du dosage de la TSH sur l'UniCel DxI 800® (69).



**Figure 11** : Principe du dosage de la T4I sur l'UniCel DxI 800® (70).

### **III- ETUDE ANALYTIQUE DU BILAN THYROÏDIEN**

Pour comparer les résultats des dosages de la TSH, T4l et T3l obtenus avec les techniques radioimmunologiques du laboratoire à ceux obtenus avec le DxI®, nous avons utilisé des sérums issus de notre activité de routine et de la sérothèque du laboratoire.

#### **III.1-Techniques de dosage du DxI®**

##### **III.1.1- Dosage de la TSH**

Il s'agit d'un test immunoenzymoluminométrique de type « sandwich » en une étape de troisième génération (sensibilité fonctionnelle  $\leq 0,01$  mUI/l). L'anticorps de capture est un anticorps monoclonal de souris anti-TSH fixé sur la phase solide par des anticorps de chèvre anti-souris, et l'anticorps marqué à la phosphatase alcaline est un anticorps de chèvre anti-TSH (*Figure 10*). La quantité de TSH présente dans l'échantillon est déterminée par rapport à une gamme d'étalonnage en 6 points de 0 à 100 mUI/l. Les standards sont calibrés par rapport à la deuxième préparation internationale de référence 80/558 de l'OMS (69).

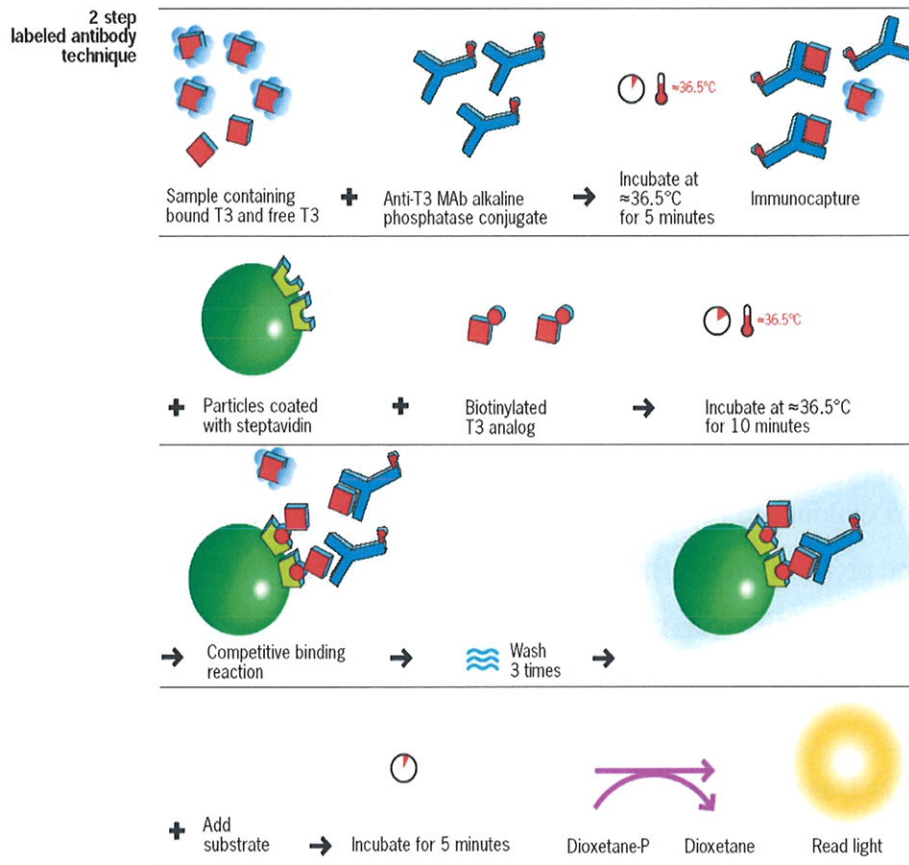
Les valeurs de référence préconisées par le fabricant sont comprises entre 0,15 et 3,70 mUI/l (69).

##### **III.1.2- Dosage de la T4l**

Il s'agit d'un test immunoenzymoluminométrique par compétition en deux étapes. La compétition s'établit entre la T4l contenue dans l'échantillon et un analogue de la T4 (T3) couplé à la phosphatase alcaline vis-à-vis d'un anticorps monoclonal anti-T4 couplé à la biotine. La séparation des complexes antigènes-anticorps fait intervenir le couple streptavidine (fixée à la surface des particules paramagnétiques) – biotine (*Figure 11*).

Les matériels liés à la phase solide sont maintenus dans un champ magnétique tandis que les matériels non liés sont éliminés par lavage. La quantité de T4l présente dans l'échantillon est déterminée par rapport à une gamme d'étalonnage en 6 points de 0 à 77,2 pmol/l (70).

Les valeurs de référence préconisées par le fabricant sont comprises entre 7,5 et 13,8 pmol/l (70).



**Figure 12** : Principe du dosage de la T3I sur l'UniCel DxI 800 (71).

### **III.1.3- Dosage de la T3I**

Il s'agit d'un test immunoenzymoluminométrique par compétition en deux étapes. La compétition s'établit entre la T3I contenue dans l'échantillon et un analogue de la T3 (T3 biotinylée) vis-à-vis des anticorps monoclonaux anti-T3 conjugués à la phosphatase alcaline. La séparation des complexes antigènes-anticorps fait intervenir le couple streptavidine (fixée à la surface des particules paramagnétique) – biotine (*Figure 12*). La quantité de T3I présente dans l'échantillon est déterminée par rapport à une gamme d'étalonnage en 6 points de 0 à 46 pmol/l (71).

Les valeurs de référence préconisées par la fabricant sont comprises entre 3,8 à 6 pmol/l (71).

## **III.2- Techniques radioimmunologiques utilisées en routine au laboratoire**

Il s'agit de techniques radioimmunologiques Immunotech® commercialisées par la société Beckman Coulter utilisées en routine au laboratoire de janvier 1996 à juillet 2006 selon une procédure manuelle, considérées comme méthode de référence mais inaccessibles pour un grand nombre de laboratoires compte tenu des contraintes réglementaires quant à l'utilisation des radioisotopes.

### **III.2.1- Dosage IRMA de la TSH**

Il s'agit d'un dosage immunoradiométrique de type sandwich (IRMA) en une étape de deuxième génération. L'anticorps de capture est un anticorps monoclonal fixé à la surface des tubes, l'anticorps de révélation est un anticorps monoclonal marqué à l'iode 125. La radioactivité liée est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. La concentration en TSH est calculée par rapport à une gamme d'étalonnage en 7 points de 0 et 50 mUI/l (72).

Les valeurs de référence préconisées par le fabricant sont comprises entre 0,17 et 4,05 mUI/l (72).

### **III.2.2- Dosage RIA la T4I**

C'est un dosage radioimmunologique par compétition (RIA) en une étape utilisant le principe de l'anticorps marqué. La compétition s'établit entre la T4I de l'échantillon et l'analogue de la T4 (T4 biotinylée) pour la liaison à l'anticorps monoclonal marqué à l'iode



Dosage	Principe	Prise d'essais en $\mu$ l	Temps d'incubation en min	Gamme de mesure	Valeurs normales
<i>T4I Dxl®</i>	<i>Compétition</i> 2 étapes Analogue marqué	30	17	1 à 77 pmol/l	7,5 à 13,8 pmol/l
<i>T4I RIA</i>	<i>Compétition</i> 1 étape Anticorps marqué	50	90	0,4 à 75 pmol/l	11,5 à 23 pmol/l
<i>T3I Dxl®</i>	<i>Compétition</i> 2 étapes Anticorps marqué	55	20	1,4 à 46 pmol/l	3,8 à 6 pmol/l
<i>T3I RIA</i>	<i>Compétition</i> 1 étape Anticorps marqué	100	120	0,5 à 44 pmol/l	2,5 à 5,8 pmol/l
<i>TSH Dxl®</i>	<i>Sandwich</i> 1 étape	110	35	0,006 à 100 mUI/l	0,15 à 3,7 mUI/l
<i>TSH IRMA</i>	<i>Sandwich</i> 1 étape	200	120	0,0025* à 50 mUI/l	0,17 à 4,05 mUI/l

\*En routine, au laboratoire la limite de détection a été fixée à 0,06 mUI/l

**Tableau 10** : Principales caractéristiques techniques des dosages de la TSH, T4I et T3I réalisés : RIA, IRMA, Dxl® (69-74).



125. Seuls les complexes anticorps-analogues biotinylés de la T4 se fixent sur les tubes recouverts de streptavidine. La concentration en T4I est calculée par rapport à une gamme d'étalonnage en 5 points de 0 à 75 pmol/l (73).

Les valeurs de référence préconisées par le fabricant sont comprises entre 11,5 et 23 pmol/l (73).

### **III.2.3- Dosage RIA de la T3I**

C'est un dosage radioimmunologique par compétition (RIA) en une étape utilisant également le principe de l'anticorps marqué. La compétition s'établit entre la T3I de l'échantillon et un analogue de la T3I fixé à la surface des tubes pour la liaison à l'anticorps marqué à l'iode 125. La concentration en T3I est calculée par rapport à une gamme d'étalonnage en 5 points de 0 et 44 pmol/l de T3I (74).

Les valeurs de référence préconisées par le fabricant sont comprises entre 2,5 et 5,8 pmol/l (74).

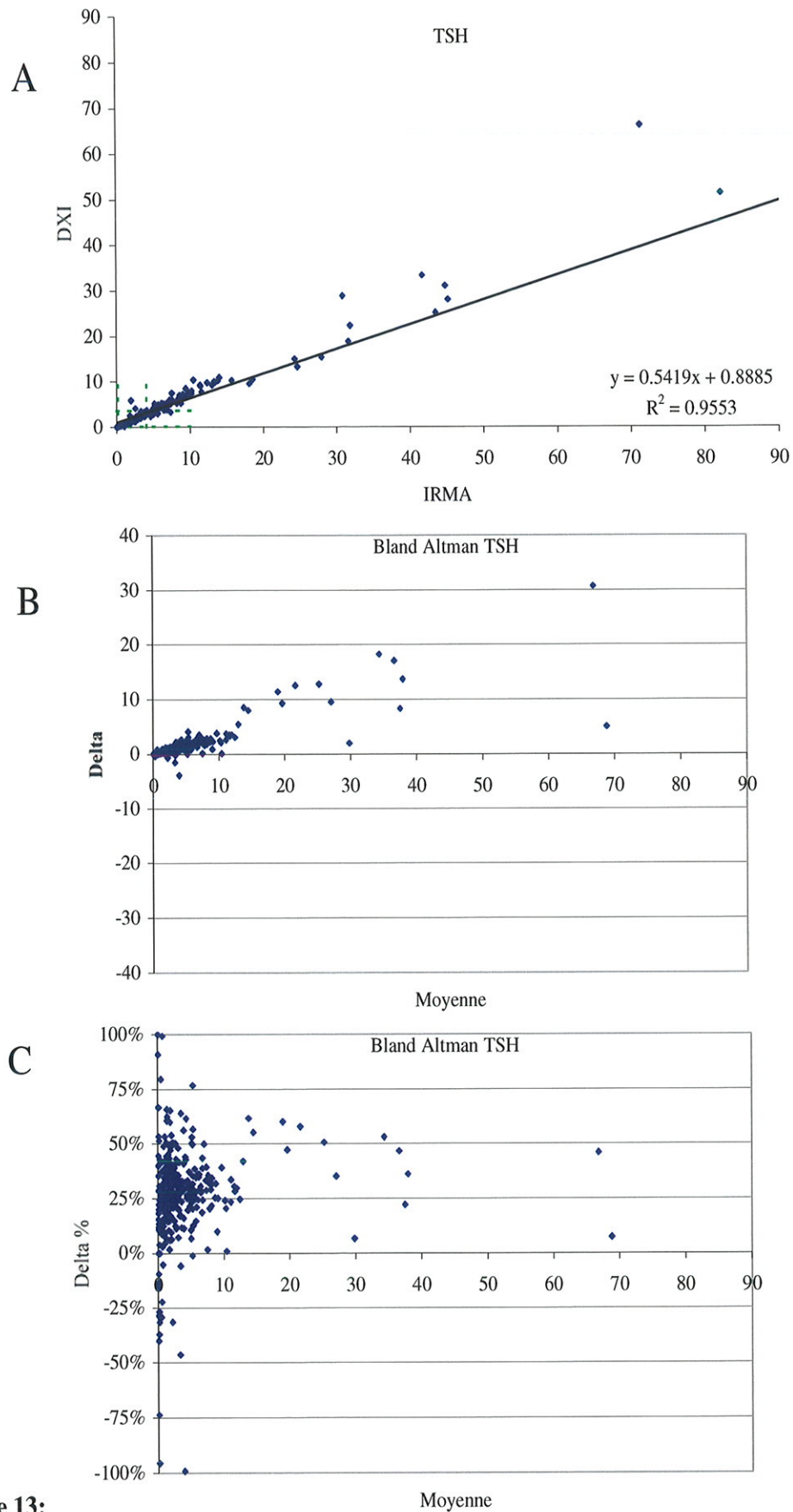
Les principales caractéristiques des dosages de la T4I, T3I et TSH selon la technique figurent dans le *Tableau 10*.

## **III.3- Résultats**

### **III.3.1- Comparaison TSH DxI®/ TSH IRMA Immunotech®**

Au total 416 sérums ont été dosés avec les 2 techniques. Après exclusion des concentrations inférieures à la limite de détection et supérieures au dernier étalon de chaque gamme (soit 0,006 à 100 mUI/l pour le DxI®, et 0,06 à 50 mUI/l pour la technique IRMA) (N = 89), nous avons obtenu 327 résultats.

Les valeurs de la TSH obtenues avec le DxI® se distribuent de façon non gaussienne entre 0,01 et 66,29 mUI/l avec une valeur médiane à 1,90 mUI/l. Les valeurs de la TSH obtenues avec la technique IRMA se distribuent de façon non gaussienne entre 0,07 et 82,15 mUI/l avec une valeur médiane à 2,53 mUI/l.



**Figure 13:**

**A:** Comparaison TSH DxI®/ TSH IRMA (N = 327 valeurs détectables).

**B:** Représentation de Bland-Altman en valeurs absolues (TSH IRMA-TSH DxI®/ valeur moyenne).

**C:** Représentation de Bland-Altman en valeurs relatives [(TSH IRMA-TSH DxI®)/TSH IRMA]/ valeur moyenne.

La droite de régression avec  $R^2 : 0,9553$  met en évidence une relation statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) entre les résultats obtenus avec les deux techniques (*Figure 13A*).

Le diagramme de Bland-Altman (*Figure 13B*) en valeurs absolues montre que les valeurs rendues avec la technique IRMA sont supérieures par rapport à celles rendues avec le DxI®.

Le diagramme de Bland-Altman (*Figure 13C*) en valeurs relatives montre que le pourcentage d'écart entre les deux valeurs est plus élevé pour une valeur moyenne inférieure à 10 mUI/l.

Il nous a semblé intéressant de déterminer la concordance diagnostique de l'ensemble des valeurs obtenues suivant la technique utilisée (*Tableau 11*).

La concordance pour un diagnostic d'euthyroïdie est de : **98%** (199/203)

La concordance pour un diagnostic d'hyperthyroïdie est de : **93%** (99/106)

La concordance pour un diagnostic d'hypothyroïdie est de : **92,5%** (99/107)

Soit une concordance globale de : **95,4%** (397/416)

		<i>DxI®</i>		
		TSH < 0,15 mUI/l	TSH normale	TSH > 3,7 mUI/l
<i>Technique IRMA</i>	TSH < 0,17 mUI/l	24% N=99	1% N=7	0% N=0
	TSH normale	0,50% N=2	48% N=199	0,50% N=2
	TSH > 4,05 mUI/l	0% N=0	2% N=8	24% N=99

**Tableau 11** : Concordance diagnostique des valeurs de TSH en fonction de la technique utilisée (N = 416 valeurs).



Sur l'ensemble des sérums dosés **4,6%** (N = 19) discordent en fonction de la technique utilisée :

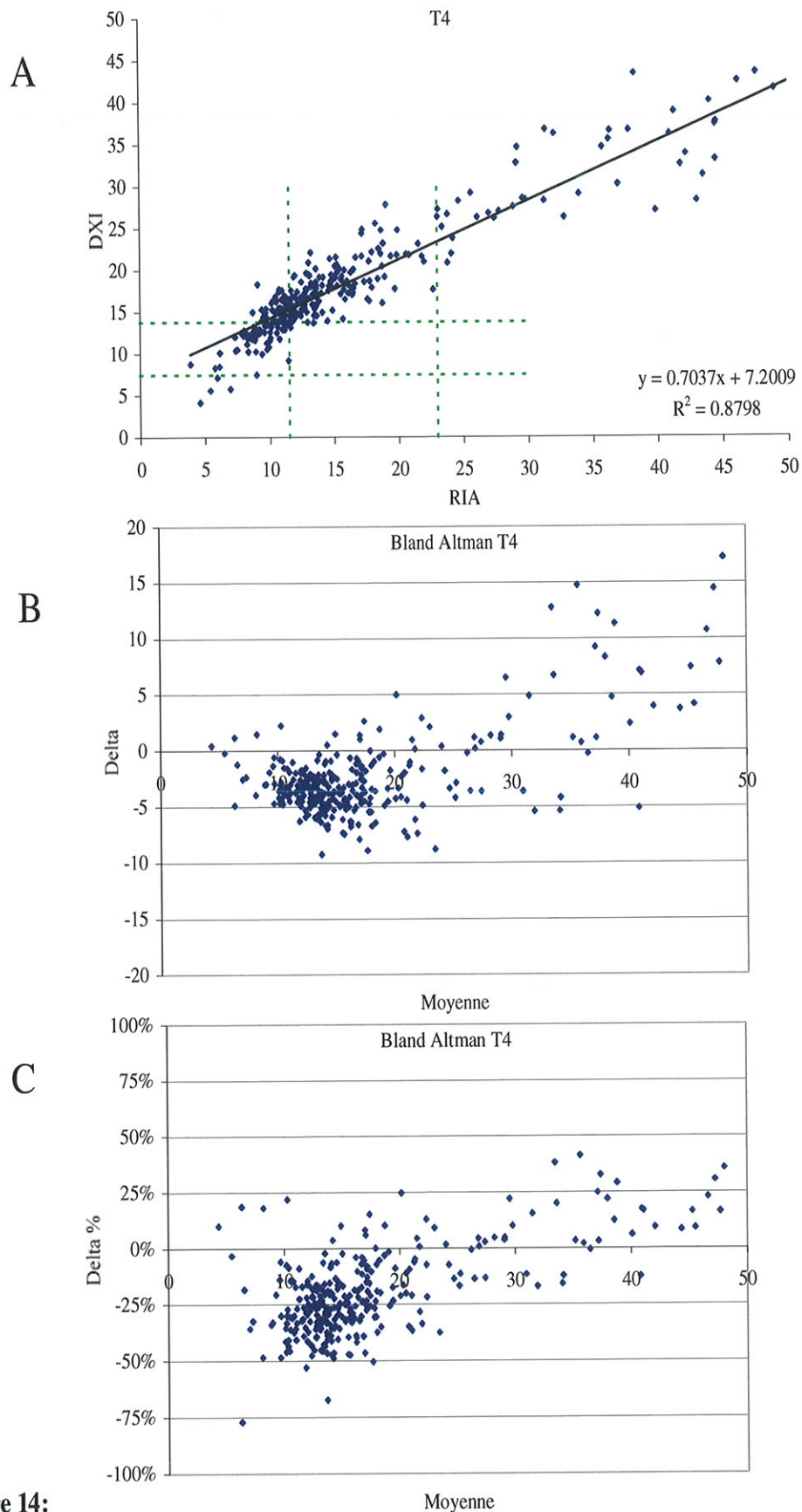
- 4 patients classés euthyroïdiens avec la technique IRMA sont classés dysthyroïdiens avec le DxI® (2 hypothyroïdiens et 2 hyperthyroïdiens) ;
- 15 patients classés dysthyroïdiens (8 hypothyroïdiens et 7 hyperthyroïdiens) avec notre technique IRMA sont classés euthyroïdiens avec le DxI®.

Les valeurs de TSH obtenues pour ces 19 patients avec les deux techniques sont présentées dans le **Tableau 12**.

TSH IRMA en mUI/l (N : 0,17 à 4,05)	TSH DxI® correspondante en mUI/l (N : 0,15 à 3,7)	Interprétation TSH IRMA	Interprétation TSH DxI®
0,06	0,17	↓	N
0,06	0,2		
0,06	0,47		
0,11	0,16		
0,13	0,15		
0,13	0,17		
0,16	0,22		
0,19	0,11	N	↓
0,22	0,13	N	↓
1,99	5,91	N	↑
2,57	4,12	N	↑
4,64	2,39	↑	N
4,71	3,11		
4,9	3,52		
4,99	2,8		
5,07	3,24		
5,14	3,33		
5,61	2,97		
7,36	3,28		

↓ : basse, ↑ : élevée, N : normale

**Tableau 12** : Valeurs de TSH discordantes entre les deux techniques.





### III.3.2- Comparaison T4I DxI®/ T4I RIA Immunotech®

Au total 317 sérums ont été dosés avec les 2 techniques. Après exclusion des concentrations inférieures à la limite de détection et supérieures au dernier étalon de chaque gamme (soit 1 à 77 pmol/l pour le DxI®, et 0,4 à 75 pmol/l pour la technique RIA) (N = 17), nous avons obtenu 300 résultats.

Les valeurs de la T4I DxI® se distribuent de façon non gaussienne entre 3,90 et 56,70 pmol/l avec une valeur médiane à 13 pmol/l. Les valeurs de la T4I RIA se distribuent de façon non gaussienne respectivement entre 4,20 à 43,90 pmol/l avec une valeur médiane à 16,70 pmol/l.

La droite de régression avec  $R^2 : 0,8798$  (*Figure 14A*) met en évidence une relation statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) entre les résultats obtenus avec les deux techniques.

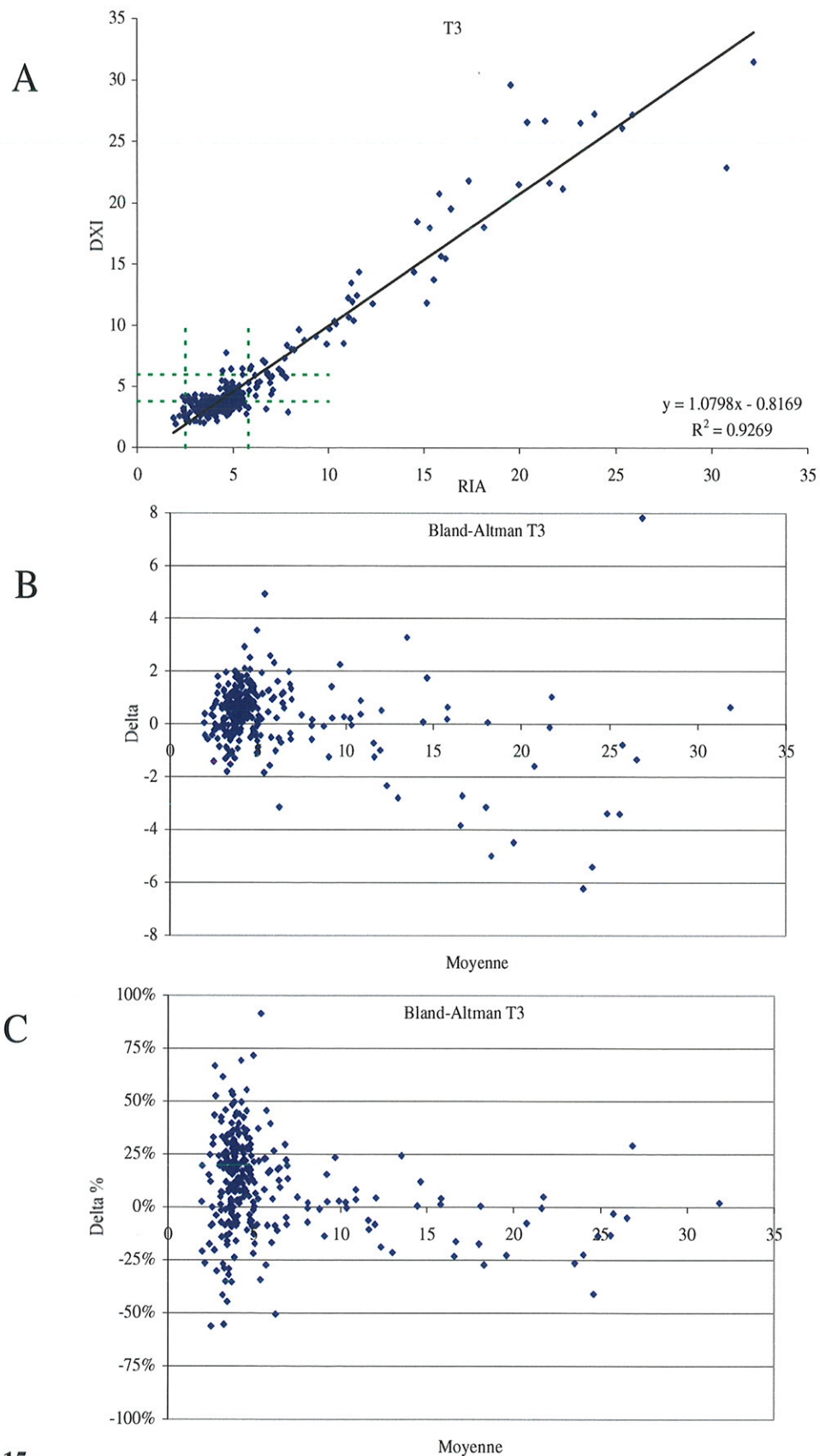
Le diagramme de Bland-Altman en valeurs absolues (*Figure 14B*) met en évidence que pour des valeurs de T4I comprises entre 10 et 20 pmol/l sur le diagramme, le DxI® donne des valeurs plus élevées, alors qu'à partir de 25 pmol/l la relation est moins nette.

Le diagramme de Bland-Altman en valeurs relatives (*Figure 14C*) confirme la supériorité des valeurs obtenues avec le DxI® avec un pourcentage d'écart entre les deux valeurs pouvant atteindre 50%.

La concordance diagnostique de l'ensemble des valeurs obtenues suivant la technique utilisée figure dans le *Tableau 13*.

		<i>DxI®</i>		
		T4I < 7,5 pmol/l	T4I normale	T4I > 13,8 pmol/l
<i>Technique RIA</i>	T4I < 11,5 pmol/l	2,5% N=8	17% N=53	14,5% N=46
	T4I normale	0% N=0	1% N=3	46% N=147
	T4I > 23 pmol/l	0% N=0	0% N=0	19% N=60

**Tableau 13** : Concordance diagnostique des valeurs de T4I en fonction de la technique utilisée (N = 317 valeurs).



**Figure 15:**

**A:** Comparaison T31 RIA/ T31 DxI® (N = 285 valeurs détectables).

**B:** Représentation de Bland -Altman en valeurs absolues (T31 RIA – T31 DxI®) / valeur moyenne.

**C:** Représentation de Bland-Altman en valeurs relatives [(T31 RIA- T31 DxI®)/T31 RIA]/ valeur moyenne.



Sur l'ensemble des sérums dosés, **78%** discordent (N = 246) en fonction de la technique utilisée :

- 17% des sérums ont une concentration de T4l basse avec la technique RIA et normale avec le DxI® ;
- 15% des sérums ont une concentration de T4l basse avec la technique RIA et augmentée avec le DxI® ;
- 46% des sérums ont une concentration de T4l normale avec la technique RIA et augmentée avec le DxI®.

### III.3.3- Comparaison T3l DxI®/ T3l RIA Immunotech®

Au total 288 sérums ont été dosés avec les 2 techniques. Après exclusion des concentrations inférieures à la limite de détection et supérieures au dernier étalon de chaque gamme (soit pour le DxI®, 1,5 à 46 pmol/l et 0,5 à 44 pmol/l pour la technique RIA) (N = 3), nous avons obtenu 285 résultats.

Les valeurs de la T3l DxI® se distribuent de façon non gaussienne entre 1,87 et 32,20 pmol/l avec une valeur médiane à 4,56 pmol/l. Les valeurs de la T3l RIA se distribuent de façon non gaussienne respectivement entre 1,80 et 31,50 pmol/l avec une valeur médiane à 3,87 pmol/l.

La droite de régression avec  $R^2 : 0,9269$  (*Figure 15A*) met en évidence une relation statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) entre les résultats obtenus avec les deux techniques.

La représentation de Bland-Altman en valeurs absolues (*Figure 15B*) montre que pour des valeurs comprises approximativement entre 1 et 5 pmol/l la technique RIA donne des valeurs plus hautes que le DxI® alors qu'à partir de 10 pmol/l la relation est moins nette et semble s'inverser.

La représentation de Bland-Altman en valeurs relatives (*Figure 15C*) montre que la dispersion exprimée en pourcentage entre les deux valeurs obtenues est beaucoup plus importante dans les valeurs normales que dans les valeurs hautes.



La concordance diagnostique de l'ensemble des valeurs obtenues suivant la technique utilisée figure dans le **Tableau 14**.

		<b>DxI®</b>		
		<b>T3I &lt; 3,8 pmol/l</b>	<b>T3I normale</b>	<b>T3I &gt; 6 pmol/l</b>
<b>Technique RIA</b>	<b>T3I &lt; 2,5 pmol/l</b>	<b>3,5%</b> N=10	<b>0,4%</b> N=1	<b>0%</b> N=0
	<b>T3I normale</b>	<b>37%</b> N=106	<b>34%</b> N=98	<b>4,2%</b> N=12
	<b>T3I &gt; 5,8 pmol/l</b>	<b>0,4%</b> N=1	<b>2,5%</b> N=7	<b>18%</b> N=53

**Tableau 14** : Concordance diagnostique des valeurs de T3I en fonction de la technique utilisée (N = 317 valeurs).

Sur l'ensemble des sérums dosés, **44%** (N = 127) discordent en fonction de la technique utilisée :

- 1 sérum a une concentration de T3I basse avec la technique RIA et normale avec le DxI® ;
- 37% des sérums ont une concentration de T3I normale avec la technique RIA et basse avec le DxI® ;
- 4,2% des sérums ont une concentration de T3I normale avec la technique RIA et augmentée avec le DxI® ;
- 1 sérum a une concentration de T3I augmentée avec la technique RIA et basse avec le DxI® ;
- 2,5% des sérums ont une concentration de T3I augmentée avec la technique RIA et normale avec le DxI®.

Afin de déterminer si les discordances observées, entre les deux techniques, dans certains intervalles de valeurs peuvent s'expliquer par un problème d'imprécision de l'automate, nous avons réalisé pour les deux paramètres les plus discordants (T4I et T3I) un test de précision.

Valeur RIA	T3I RIA ↓ 1,87	T3I RIA N 4,75	T3I RIA ↑ 6,86	T4I RIA ↓ 5,38	T4I RIA N 14,7	T4I RIA ↑ 40,21
Valeur DxI®						
1	3,6	5,0	6,9	5,7	15,1	52,1
2	3,6	4,8	6,6	5,5	15,2	52,2
3	3,5	4,8	7,3	5,9	15,5	52,2
4	3,5	4,9	6,6	5,7	15,6	48,1
5	3,2	4,8	7,1	5,9	16,0	53,5
6	3,4	4,5	6,4	4,8	16,4	54,2
7	2,9	4,2	6,2	5,0	15,5	52,1
8	2,8	4,1	5,8	5,3	14,5	52,7
9	2,9	4,1	6,5	5,7	16,7	52,9
10	3,0	4,6	6,2	5,1	15,3	50,3
<b>Moyenne</b>	<b>3,2</b>	<b>4,6</b>	<b>6,5</b>	<b>5,5</b>	<b>15,6</b>	<b>52,0</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,7</b>	<b>1,7</b>
<b>CV (%)</b>	<b>9,9</b>	<b>7,3</b>	<b>6,9</b>	<b>7,1</b>	<b>4,2</b>	<b>3,3</b>
<b>Médiane</b>	<b>3,3</b>	<b>4,7</b>	<b>6,5</b>	<b>5,6</b>	<b>15,5</b>	<b>52,2</b>

**Tableau 15** : Résultats du test de répétabilité pour la T4I et la T3I (valeurs en pmol/l).

Valeur RIA	T3I RIA ↓ 1,87	T3I RIA N 4,75	T3I RIA ↑ 6,86	T4I RIA ↓ 5,38	T4I RIA N 14,7	T4I RIA ↑ 40,21
Valeur DxI®						
J1	3,4	4,8	6,9	5,5	14,7	51,4
J2	2,7	4,2	5,9	4,7	15,8	50,3
J3	3,2	4,5	6,9	4,9	15,4	52,7
J4	3,3	4,8	6,9	5,0	15,7	54,2
J5	3,3	4,8	6,6	5,1	14,5	57,7
J6	2,9	4,2	6,3	5,4	16,2	59,1
J7	3,4	4,7	6,9	5,0	14,9	59,4
J8	3,1	4,5	6,3	5,1	14,0	61,9
J9	2,8	3,9	5,6	4,1	12,8	54,4
J10	3,1	3,9	5,7	5,0	13,4	54,1
<b>Moyenne</b>	<b>3,1</b>	<b>4,4</b>	<b>6,4</b>	<b>5,0</b>	<b>14,7</b>	<b>55,5</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>1,1</b>	<b>3,8</b>
<b>CV (%)</b>	<b>8,2</b>	<b>7,7</b>	<b>8,2</b>	<b>7,6</b>	<b>7,4</b>	<b>6,8</b>
<b>Médiane</b>	<b>3,1</b>	<b>4,5</b>	<b>6,4</b>	<b>5,0</b>	<b>14,8</b>	<b>54,3</b>

**Tableau 16** : Résultats du test de reproductibilité pour la T4I et la T3I (valeurs en pmol/l).

### **III.3.4- Test de précision de la T4I et T3I sur le DxI®**

Nous avons sélectionné parmi les sérums dosés en routine au laboratoire avec la technique RIA, des sérums présentant des valeurs normales, basses et hautes de T4I et de T3I.

Pour déterminer la précision intra-série (test de répétabilité) nous avons dosé chacun de ces sérums 10 fois dans une journée dans différentes séries, l'ensemble des résultats figure dans le *Tableau 15*.

Pour déterminer la précision inter-série (test de reproductibilité) nous avons dosé ces sérums une fois par jour pendant 10 jours consécutifs, l'ensemble des résultats figure dans le *Tableau 16*.

Pour l'essai intra-série, tout comme pour l'essai inter-série les coefficients de variation sont bons car inférieur à 10%. Les dosages sont reproductibles en inter- et intra-série.

Les discordances observées entre les valeurs des hormones libres obtenues entre les deux techniques ne s'expliquent donc pas par un problème d'ordre analytique lié à l'imprécision du DxI®.

### **III.4- Discussion**

Bien que la corrélation mathématique entre les deux techniques soit bonne pour l'ensemble des paramètres du bilan thyroïdien, les résultats obtenus selon la technique discordent, pouvant affecter tout aussi bien le diagnostic que le suivi thérapeutique du patient. Ces discordances concernent moins le dosage de la TSH que celui des hormones libres (peu de patients passent du statut d'euthyroïdien au statut de dysthyroïdien) mais sont néanmoins préoccupantes car le dosage de la TSH est selon l'ANAES l'examen de première intention de l'exploration biologique de la fonction thyroïdienne.

Les différences concernant les dosages des hormones libres semblent concerner un plus grand nombre de sérums testés. Le DxI® semble donner des valeurs de T4I plus élevées et des valeurs de T3I plus basses par rapport à la technique RIA. Ces différences ne semblent pas être liées à un problème de précision de l'appareil compte tenu des bons résultats obtenus au cours des essais de répétabilité et de reproductibilité.



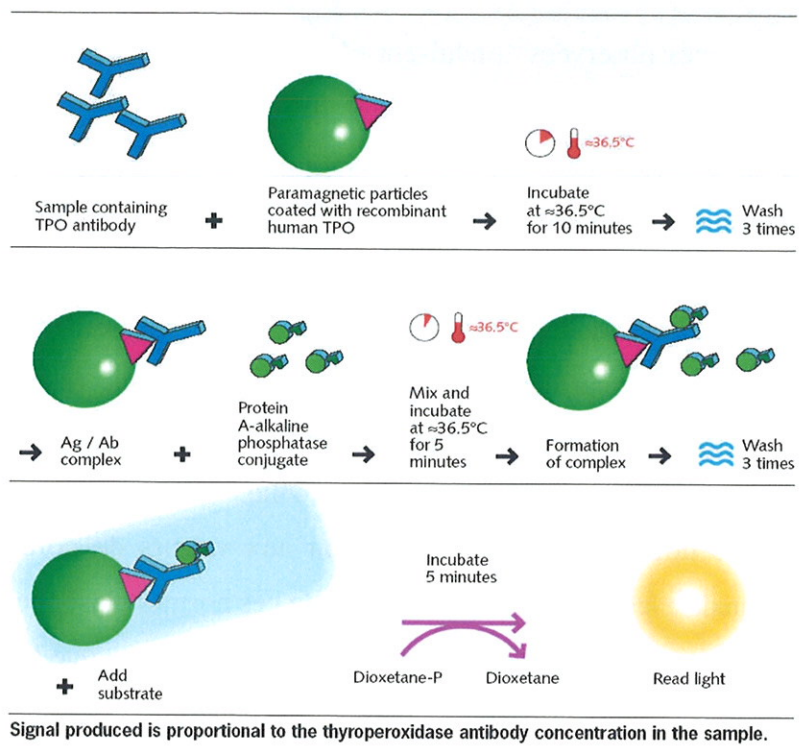
Les discordances observées conduisent plutôt à s'interroger sur les valeurs de référence préconisées par le fabricant pour le DxI®. En effet, pour l'automate les intervalles de référence de la T4I semblent trop bas par rapport à ceux indiqués par la technique RIA expliquant pourquoi la majorité de sérums a une concentration de T4I élevée avec le DxI® et normale avec la RIA.

Devant cette observation se pose le problème de l'établissement des valeurs normales. Chaque laboratoire est tenu d'établir ses propres intervalles de référence pour assurer une représentation correcte des populations spécifiques, chose plus facilement réalisable dans les laboratoires de CHU que dans les laboratoires de ville.

Le biologiste doit donc être vigilant quant aux valeurs de normalité précisées par le fabricant et connaître les conditions d'obtention de ces normes ainsi que les sujets concernés.

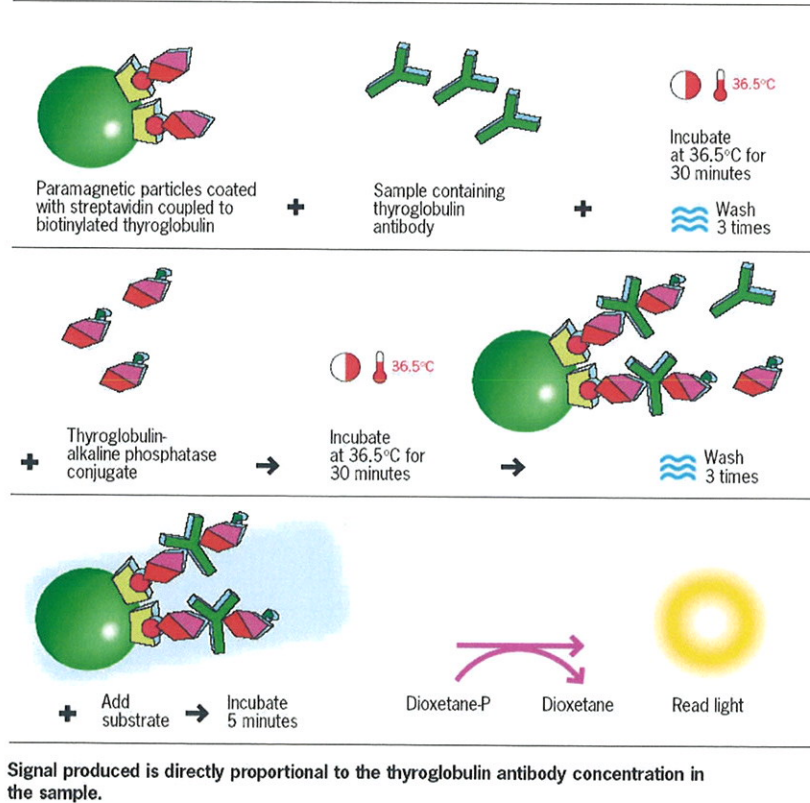
Sur le plan pratique, il est préférable lors du suivi biologique que les dosages soient plutôt réalisés par le même laboratoire et avec la même technique afin que les résultats obtenus soient comparables. Dans le cas contraire, le biologiste devra sensibiliser le patient quant à la possibilité de variations inter laboratoires des résultats.

**1 step sandwich technique**



**Figure 16** : Principe du dosage des anticorps anti-TPO sur le DxI® (75).

**2 step sandwich technique**



**Figure 17** : Principe du dosage des anticorps anti-Tg sur le DxI® (76).



## **IV- ETUDE ANALYTIQUE DE L'AUTOIMMUNITE THYROÏDIENNE ET GASTRIQUE**

### **IV.1- Autoimmunité thyroïdienne : comparaison du dosage des anticorps anti-TPO et anti-Tg**

Dans cette partie nous avons comparé les résultats des dosages des anticorps anti-TPO et anti-Tg obtenus avec la technique radioimmunologique (RIA) BRAHMS® à ceux obtenus avec le DxI®. Pour la détermination des anticorps anti-Tg, nous avons sélectionné des sérums dosés en routine au laboratoire. Pour le dosage des anticorps anti-TPO, nous avons utilisé en plus des sérums issus de notre activité de routine des sérums issus de la sérothèque du laboratoire.

#### **IV.1.1- Techniques de dosage du DxI®**

##### **IV.1.1.1- Anticorps anti-TPO**

Il s'agit d'un test immunoenzymatique de type « sandwich » en deux étapes. Les anticorps anti-TPO contenus dans l'échantillon sont pris en sandwich entre la thyropéroxydase recombinante humaine biotinylée, fixée aux particules paramagnétiques sensibilisées à la streptavidine, et le conjugué protéine A-phosphatase alcaline (*Figure 16*). La concentration est déterminée à l'aide d'une gamme d'étalonnage en 6 points allant de 0 à 1000 UI/ml. Les calibrateurs sont calibrés par rapport au standard international 66/387 de l'OMS (75).

Le seuil de positivité est établi par la fabricant en se basant sur un référentiel nord américain et est fixé à 9 UI/ml (75).

##### **IV.1.1.2- Anticorps anti-Tg**

Il s'agit d'un test immunoenzymatique de type « sandwich » en deux étapes.

Les anticorps anti-Tg contenus dans l'échantillon sont pris en sandwich entre la thyroglobuline humaine biotinylée, fixée aux particules paramagnétiques sensibilisées à la streptavidine, et le conjugué thyroglobuline humaine-phosphatase alcaline (*Figure 17*). La concentration des anticorps anti-Tg présente dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage en 6 points allant de 0 à 2500 UI/ml. Les calibrateurs sont calibrés par rapport au standard international 65/93 de l'OMS (76).

Dosage	Principe	Prise d'essais en $\mu$ l	Temps d'incubation en min	Nature de l'antigène cible	Gamme de mesure en UI/ml	Seuil de Positivité en UI/ml
AC anti-TPO DxI®	Sandwich 2 étapes	10	15	TPO recombinante humaine biotinylée	0,25 à 1000	9
AC anti-TPO RIA	Compétition 1 étape	20	60	TPO native humaine	60 à 3000	60
AC anti-Tg DxI®	Sandwich 2 étapes	20	65	Tg humaine biotinylée	2,2 à 2500	4,9
AC anti-Tg RIA	Compétition 1 étape	20	120	Tg humaine purifiée	60 à 2000	60

**Tableau 17** : Principales caractéristiques techniques des dosages des anticorps anti-TPO et anti-Tg : RIA et DxI® (75-78).

Le seuil de positivité établi par le fabricant en se basant sur un référentiel nord américain est fixé à 4,9 UI/ml (76).

## **V.1.2- Techniques radioimmunologiques (Brahms®) de routine du laboratoire**

### **IV.1.2.1- Anticorps anti-TPO**

Il s'agit d'un dosage radioimmunologique par compétition. Les autoanticorps de l'échantillon et les anticorps monoclonaux, d'origine murine, anti-thyropéroxydase humaine immobilisés à la surface du tube entrent en compétition vis-à-vis de la TPO marquée à l'iode 125. La TPO utilisée est native, active enzymatiquement extraite de thyroïdes humaines. Le titre des anticorps est calculé à partir d'une courbe d'étalonnage allant de 0 à 3000 U/ml. Les standards sont calibrés par rapport au standard international 66/387 de l'OMS (77).

Le seuil de positivité établi par le fabricant est fixée à 60 U/ml (77).

### **IV.1.2.2- Anticorps anti-Tg**

Il s'agit d'un dosage radioimmunologique par compétition. Les autoanticorps de l'échantillon et les autoanticorps humains polyclonaux anti-Tg immobilisés à la surface du tube entrent en compétition vis-à-vis de la thyroglobuline marquée à l'iode 125. Les autoanticorps polyclonaux anti-Tg sont obtenus par chromatographie d'affinité à partir de sérums de patients présentant une thyroïdite autoimmune, assurant ainsi selon le fabricant la reconnaissance de toutes les classes et sous classes d'anticorps anti-Tg. En conséquence, les autoanticorps humains polyclonaux anti-Tg correspondent aux anticorps à déterminer dans le sérum et entrent en compétition vis à vis des mêmes sites épitopiques de la thyroglobuline radiomarquée. La thyroglobuline utilisée est d'origine humaine, purifiée extraite de la glande thyroïde. Le titre des anticorps est calculé à partir d'une courbe d'étalonnage allant de 0 à 2000 U/ml. Les standards sont calibrés à partir de préparation internationale de référence 65/93 de l'OMS (78).

Le seuil de positivité établi par le fabricant est fixée à 60 U/ml (78).

Les principales caractéristiques techniques des dosages des anti-TPO et anti-Tg selon la technique figurent dans le *Tableau 17*.

	AC anti-TPO DxI® <i>POSITIFS</i>	AC anti-TPO DxI® <i>NEGATIFS</i>	Total
AC anti-TPO RIA <i>POSITIFS</i>	76	0	76
AC anti-TPO RIA <i>NEGATIFS</i>	8	128	136
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>128</b>	<b>212</b>

**Tableau 18** : Comparaison des techniques DxI®/RIA pour le dosage des anticorps anti-TPO.

	AC anti-Tg DxI® <i>POSITIFS</i>	AC anti-Tg DxI® <i>NEGATIFS</i>	Total
AC anti-Tg RIA <i>POSITIFS</i>	4	0	4
AC anti-Tg RIA <i>NEGATIFS</i>	9	66	75
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>66</b>	<b>79</b>

**Tableau 19** : Comparaison des techniques DxI®/RIA pour le dosage des anticorps anti-Tg.

### IV.1.3- Résultats

#### IV.1.3.1- Comparaison anti-TPO DxI®/ anti-TPO RIA

Le nombre de sérum dosé avec les deux techniques est de 212. Le nombre de sérums détectables en prenant en compte les limites de détection est de 41 avec la technique RIA de routine (136 échantillons indétectables et 35 échantillons supérieurs à 3000 U/ml) et de 181 avec le DxI® (12 indétectables et 19 supérieurs à 1000 UI /ml).

Le test de  $\chi^2$  ne met pas en évidence une différence statistiquement significative entre les valeurs trouvées avec les deux techniques ( $p > 0,05$ ). Les résultats obtenus avec les deux techniques figurent dans le *Tableau 18*.

La concordance entre les positifs est de : **100%**

La concordance entre les négatifs est de : **94%** (128/136)

Soit une concordance globale de : **96%** [(76 + 128) / 212]

Sur l'ensemble des sérums, **4%** (N = 8) discordent entre les deux techniques. Il s'agit de 8 sérums dosés et contrôlés négatifs (inférieurs à 60 U/ml) avec la technique RIA et trouvés positifs avec le DxI® aux valeurs suivantes : 9,3 ; 12 ; 12 ; 16 ; 18 ; 27; 40 et 276 UI/ml pour un seuil de positivité établi à 9 UI/ml. Remarquons néanmoins que pour 5 sérums, la valeur trouvée est proche du seuil de positivité (9 UI/ml).

Les sérums discordants ont été redosés à 10 reprises sur le DxI® et les résultats se sont confirmés, aucun sérum n'est passé d'une valeur positive à une valeur négative.

#### IV.1.3.2- Comparaison anti-Tg DxI®/ anti-Tg RIA

Le nombre de sérums dosés avec les deux techniques est de 79. Le nombre de sérums détectables en prenant en compte les limites de détection est de 2 avec la technique RIA (75 échantillons indétectables inférieurs à 60 U/ml et 2 échantillons supérieurs à 2000 U/ml) et de 56 avec le DxI® (23 échantillons indétectables inférieurs à 2,2 UI/ml).

Le test de  $\chi^2$  ( $p = 0,021$ ) met en évidence une différence statistiquement significative entre les valeurs obtenues avec la technique RIA et le DxI®. Les résultats obtenus avec les deux techniques figurent dans le *Tableau 19*.

La concordance entre les positifs est de : **100%**.

La concordance entre les négatifs est de : **88%** (66/75).

Soit une concordance globale de : **89%** [(66 + 4) / 79]

Sur l'ensemble des sérums dosés, **11%** (N = 9) discordent en fonction de la technique utilisée.

Passage N°	Anti-TPO en UI/ml (seuil de positivité à 9 UI/ml)		
	1	8,5	12,1
2	8,8	11,9	15,2
3	9,1	11,1	12,7
4	8,5	11,8	12,7
5	9,2	12,1	13,5
6	8,1	11,8	13,8
7	8,9	11,6	13,6
8	8,5	11,8	13,2
9	9	12	13,8
10	8,7	11,4	13,4
<b>Moyenne</b>	<b>8,7</b>	<b>11,8</b>	<b>13,6</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>
<b>CV (%)</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>5</b>

**Tableau 20** : Essai de répétabilité pour les anticorps anti-TPO sur le DxI®.

Passage N°	Anti-Tg en UI/ml (seuil de positivité 4,9 UI/ml)		
	1	3,4	7
2	<2,2	5,2	9,3
3	<2,2	5,5	7
4	<2,2	5,3	7,3
5	<2,2	5,7	7,4
6	<2,2	5,6	8,7
7	<2,2	5,7	8,2
8	<2,2	5,5	8,2
9	<2,2	6,1	8,5
10	<2,2	6	10,4
<b>Moyenne</b>	<b>2,3</b>	<b>5,8</b>	<b>8,4</b>
<b>Ecart type</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
<b>CV (%)</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>12</b>

**Tableau 21** : Essai de répétabilité pour les anticorps anti-Tg sur le DxI®.

Il s'agit de 9 sérums dosés et contrôlés négatifs avec la technique RIA (< 60 U/ml) et trouvés positifs avec le DxI® aux valeurs suivantes : 5,60 ; 8,60 ; 10,70 ; 12,20 ; 13,50 ; 21 ; 27,60 ; 54,20 ; 691,90 UI/ml. Contrairement aux anticorps anti-TPO, un seul sérum est proche de seuil de positivité (4,9 UI/ml).

Les sérums discordants ont été redosés sur le DxI® à 10 reprises et les résultats se sont confirmés.

#### **IV.1.3.3- Test de répétabilité**

Pour expliquer les discordances observées par un problème d'imprécision de l'automate, nous avons réalisé un test de répétabilité intra-série pour les anticorps anti-TPO et anti-Tg.

Pour cela, nous avons sélectionné des sérums proches du seuil de positivité que nous avons dosé à 10 reprises. Les moyennes, coefficients de variation et écarts-type figurent dans les *Tableaux 20* et *21*.

En ce qui concerne les anticorps anti-TPO. Le sérum inférieur au seuil de positivité reste négatif à 10 reprises. Les 2 sérums proches du seuil de discrimination sont retrouvés à 10 reprises supérieurs à ce seuil. Aucun sérum n'est passé de positif à négatif. Les coefficients de variation pour les trois sérums testés sont corrects (< 10%).

Pour les anticorps anti-Tg, le sérum proche du seuil analytique passe de détectable à indétectable avec des résultats inférieur à 2,2 UI/ml expliquant le coefficient de variation de 16% pour ce sérum. Les deux autres sérums testés sont retrouvés positifs à 10 reprises.

Les coefficients de variation trouvés avec les anticorps anti-Tg sont moins satisfaisants que ceux trouvés avec les anticorps anti-TPO.

#### **IV.1.4- Discussion**

Les discordances observées entre les deux techniques pour le dosage des anticorps anti-thyroïdiens concernent des sérums qui passent de valeurs négatives avec la technique RIA à des valeurs positives avec le DxI®. Ces différences entre les valeurs obtenues avec les deux techniques sont statistiquement significatives pour les anticorps anti-Tg.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces discordances.

Les méthodes de dosage des autoanticorps reposent sur des principes différents, l'une utilise le principe de compétition et l'autre le principe « sandwich » et sont donc difficilement comparables.

Le seuil de positivité des anticorps anti-thyroïdiens est très différent selon la technique utilisée. Le seuil de normalité du DxI® étant beaucoup plus bas (4,9 UI/ml) que celui de la

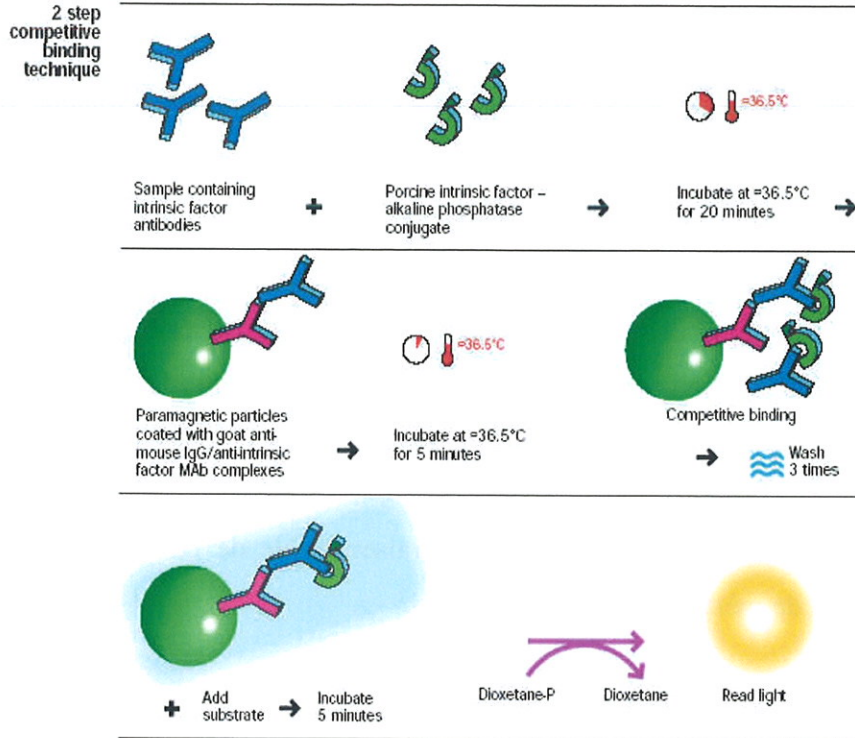




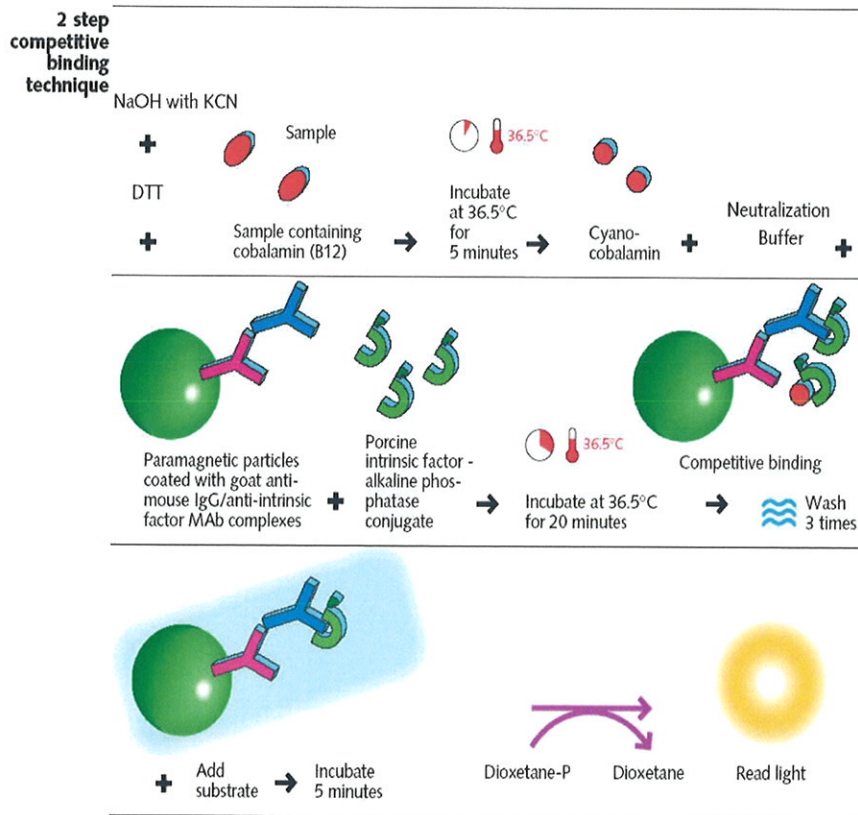
technique RIA (60 U/ml) cela pourrait expliquer le nombre plus élevé de sérums positifs avec le DxI®. De plus, les valeurs normales n'ont pas été établies pour les mêmes populations, celles du DxI® découlant d'une étude réalisée sur des sujets américains (exposés à un environnement différent, non applicables à des sujets européens).

La nature de l'antigène cible de l'autoanticorps utilisé dans la réaction entre également en jeu. Dans les deux techniques RIA, la thyropéroxydase et la thyroglobuline sont extraites de thyroïdes humaines garantissant la reconnaissance selon le fabricant, de toutes les classes et sous classe d'anticorps. Le DxI® utilise une thyropéroxydase et une thyroglobuline recombinantes humaines biotinylées. La nature des épitopes entrant dans la réaction n'est donc pas identique. Selon la technique utilisée, les différents acteurs impliqués dans la réaction ne sont pas identiques, il est donc vraisemblable de penser que les autoanticorps dosés ne sont pas de même nature.

Il est admis que selon la technique utilisée pour le dosage des autoanticorps anti-thyroïdiens, l'interprétation du bilan immunologique diffère. Au plan pratique cette discordance n'a pas vraiment de conséquence lorsque le dosage des anticorps anti-thyroïdiens est demandé afin de préciser l'étiologie autoimmune d'une maladie thyroïdienne. Ces différences sont cependant plus préoccupantes et doivent être connues du clinicien lorsque le dosage des anticorps anti-thyroglobuline s'inscrit dans le cadre du suivi des patients atteints de cancers différenciés de la thyroïde afin d'assurer la validité du dosage de la thyroglobuline utilisée dans ce contexte précis comme marqueur tumoral. Il est donc préférable dans cette situation particulière que le dosage des anticorps anti-thyroglobuline soit plutôt réalisé avec la même technique afin de limiter des problèmes d'interprétation d'ordre analytique. Dans certains cas litigieux, la réalisation d'un test de recouvrement est même utile afin de trancher quant à l'interférence réelle des autoanticorps anti-thyroglobuline, détectés ou non suivant les techniques de dosage utilisées, sur le dosage de la thyroglobuline.



**Figure 18** : Principe du dosage des anticorps antifacteur intrinsèque sur le DxI® (79).



Signal produced is inversely proportional to the vitamin B12 concentration in the sample

**Figure 19** : Principe du dosage de la vitamine B12 sur le DxI® (80).

## **IV.2- Autoimmunité gastrique : comparaison de 4 techniques de dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque**

### **IV.2.1- Matériel**

Les sérums utilisés sont issus de la sérothèque du laboratoire s'étendant sur une période d'environ 3 ans (octobre 2003 à juillet 2006).

Nous avons sélectionné les sérums de 62 patients (24 hommes et 38 femmes, âge moyen : 67 ans, extrêmes : 8 mois à 93 ans), parmi eux 15 provenaient du service de gériatrie, 10 du service de maladies infectieuses, 9 du service de médecine interne, 4 du service de cardiologie, 7 du service de neurologie, 4 du service de nutrition, 4 du service de maladies digestives, 2 du service d'hématologie, 2 du service d'endocrinologie, 1 du service de pédiatrie, 1 du service de rhumatologie, 2 du service de dermatologie, et 1 du service de psychiatrie.

Sur les sérums sélectionnés, a été réalisé un dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque avec la technique ELISA utilisée en routine au laboratoire, développée par DiaSorin®. Le dosage s'est révélé positif pour 29 patients et négatifs pour 33 patients.

La totalité des sérums a été testée avec trois autres techniques : la technique disponible sur le DxI® et deux autres techniques ELISA l'une développée par le laboratoire Bioadvance® et l'autre par le laboratoire Aeskulisa®.

### **IV.2.2- Méthodes de dosage**

#### **IV.2.2.1- Méthode de dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque sur le DxI®**

C'est une technique qui permet la détection quantitative des anticorps anti-facteur intrinsèque de type I uniquement. Il s'agit d'un test immunoenzymatique par compétition en deux étapes (*Figure 18*). La compétition s'établit entre les anticorps anti-facteur intrinsèque présents dans l'échantillon et des anticorps monoclonaux de souris spécifiques du site de liaison de la vitamine B12 sur le facteur intrinsèque vis-à-vis du facteur intrinsèque (d'origine porcine) conjugué à la phosphatase alcaline (79).

L'inconvénient majeur de cette technique est de donner de faux positifs en cas d'excès en vitamine B12 libre (après injection de vitamine B12). Pour déterminer à partir de quelle concentration en vitamine B12 on observe cette interférence, le fabricant a surchargé le calibrateur C0 (ne contenant pas d'anticorps anti-facteur intrinsèque) avec des concentrations

<i>Résultats en UA/ml</i>	<i>Interprétation des résultats</i>
R < 1,20	Négatif
1,53 < R < 1,20	Equivoque
R ≥ 1,53	Positif

**Interprétation des résultats du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque sur le DxI®**

<i>Résultats</i>	<i>Interprétation des résultats</i>
BI < 0,9	Négatif
0,9 ≤ BI < 1,1	Equivoque
BI ≥ 1,1	Positif

**Interprétation des résultats du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque avec la technique  
DiaSorin®**

croissantes en vitamine B12. Les faux positifs apparaissent à partir de 440 pmol/l. Pour cette raison tous les sérums testés ont bénéficié en parallèle d'un dosage de la vitamine B12 également accessible sur l'automate DxI®. Il s'agit d'un dosage immunoenzymatique par compétition, la compétition s'opère entre la vitamine B12 et les anticorps anti-FI fixés sur la phase solide vis-à-vis du conjugué facteur intrinsèque-phosphatase alcaline (**Figure 19**) (80).

Les résultats du dosage des anticorps anti-FI sont exprimés en UA/ml (unités d'anticorps/ml).

La calibration de ce paramètre est qualitative. Elle est réalisée sur deux points : un contrôle négatif et un contrôle positif. Le résultat est exprimé en rapport (R). Il s'agit du rapport du contrôle positif divisé par rapport au signal du patient (B0/B, où B0 = 1,00 UA/ml).

#### **IV.2.2.2- Autres méthodes de dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque : techniques ELISA.**

Nous avons testé trois techniques ELISA : ELISA DiaSorin®, ELISA Bioadvance® et ELISA Aeskulisa®. Ces techniques reposent sur le même principe.

Il s'agit d'un dosage immunoenzymatique en phase solide, basé sur le principe du « sandwich » permettant une détection qualitative des anticorps anti-facteur intrinsèque de type I et de type II. Les sérums dilués sont distribués dans des cupules revêtues par du facteur intrinsèque. Après lavage, des anticorps de lapin anti-IgG humaines conjugués à la peroxydase de Raifort sont ajoutés et se fixent aux complexes facteur intrinsèque-anticorps. La révélation s'effectue à l'aide du substrat TMB (TétraMéthylBenzidine). L'intensité de la coloration (DO) est mesurée au photomètre à 450 nm (81-83).

Ces techniques diffèrent entre elles par le taux de dilution du sérum (1/51<sup>ème</sup> pour DiaSorin® et 1/101<sup>ème</sup> pour Bioadvance® et Aeskulisa®) et par l'origine du facteur intrinsèque (origine porcine pour DiaSorin® et Bioadvance®, et recombinant humain pour Aeskulisa®) (81-83).

Pour la technique DiaSorin®, les résultats sont exprimés en indice de liaison (Binding Index = B.I), défini comme le rapport entre les valeurs d'absorbance de l'échantillon et du contrôle seuil (cut-off).

$$\mathbf{B.I = D.O \text{ échantillon} / D.O \text{ contrôle seuil}}$$

L'interprétation des résultats avec le DxI® et avec la technique Diasorin® figure ci-contre.

	Principe	Volume en $\mu$ l	Incubation en min	Nature du facteur intrinsèque	Interprétation des résultat
AC anti-FI DxI®	Compétition 2 étapes	55	30	FI porcin	R > 1,53
AC anti-FI DiaSorin®	Sandwich 2 étapes	10	70	FI porcin	BI > 1,1
AC anti-FI Aeskulisa®	Sandwich 2 étapes	10	65	FI recombinant humain	DO échantillon > DO cut off
AC anti-FI Bioadvance®	Sandwich 2 étapes	10	75	FI porcin	DO échantillon > DO cut off

**Tableau 22** : Caractéristiques du dosage des anticorps anti-FI suivant la technique (DxI®, DiaSorin®, Aeskulisa®, et Bioadvance®) (79, 81, 82, 83).

L'interprétation des résultats avec la technique Bioadvance® et Aeskulisa® se fait par rapport à un contrôle seuil (cut off) :

**Résultat négatif : DO échantillon < DO cut-off**

**Résultat positif : DO échantillon > DO cut-off**

Les caractéristiques du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque en fonction de la technique sont présentées dans le *Tableau 22*.

#### **IV.2.3- Résultats**

Le *Tableau 23* présente les résultats du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque obtenus avec les 4 techniques précédemment décrites et les résultats du dosage de la vitamine B12 effectué sur le DxI®.

Pour **40 patients** sur les 62 testés, les résultats du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque sont identiques avec les quatre techniques de dosage, 11 patients ont une concentration en anticorps anti-FI supérieure au seuil de discrimination et 29 ont une concentration inférieure à ce seuil, soit une concordance globale de 64%.

Pour **un patient** (2%) le dosage est positif avec 3 techniques : Diasorin®, le DxI® et Bioadvance®. Pour **un autre patient** (2%) le dosage s'avère positif avec deux techniques : Diasorin® et le DxI®. Les résultats sont positifs uniquement avec la technique Diasorin® pour **16 patients** (25%), uniquement avec le DxI® pour **3 patients** (5%), et uniquement avec la technique Aeskulisa® pour **un patient** (2%).

Globalement un patient sur trois a des anticorps anti-facteur intrinsèque positif avec une technique et négatif avec une autre technique.

La concordance diagnostique entre deux techniques, basée sur le calcul du coefficient kappa (k) figure dans le *Tableau 24*.

La concordance entre la **technique Bioadvance® et Aeskulisa®** est **très bonne** (k = 0,90).

La concordance entre le **DxI® et la technique Aeskulisa®** (k = 0,66), et entre le DxI® et la technique Bioadvance® (k = 0,74) est **bonne**.

La concordance entre la **technique Diasorin® et la technique Bioadvance®** (k = 0,43) est **moyenne**.

La concordance entre la **technique Diasorin® et le DxI®** (k = 0,39) et **Diasorin® et Aeskulisa®** (0,36) est **faible**.



Patient N°	AC anti-FI DiaSorin®	AC anti-FI DxI®	AC anti-FI Bio-Advance	AC anti-FI Aeskulisa®	Vit B12 DxI® [180 à 914] pg/ml
1	POS	POS	POS	POS	0
2	POS	POS	POS	POS	20
3	POS	POS	POS	POS	43
4	POS	POS	POS	POS	98
5	POS	POS	POS	POS	173
6	POS	POS	POS	POS	225
7	POS	POS	POS	POS	332
8	POS	POS	POS	POS	434
9	POS	POS	POS	POS	560
10	POS	POS	POS	POS	660
11	POS	POS	POS	POS	> 1500
12	POS	POS	POS	NEG	375
13	POS	POS	NEG	NEG	> 1500
14	POS	NEG	NEG	NEG	65
15	POS	NEG	NEG	NEG	86
16	POS	NEG	NEG	NEG	188
17	POS	NEG	NEG	NEG	192
18	POS	NEG	NEG	NEG	200
19	POS	NEG	NEG	NEG	253
20	POS	NEG	NEG	NEG	288
21	POS	NEG	NEG	NEG	307
22	POS	NEG	NEG	NEG	326
23	POS	NEG	NEG	NEG	355
24	POS	NEG	NEG	NEG	424
25	POS	NEG	NEG	NEG	425
26	POS	NEG	NEG	NEG	454
27	POS	NEG	NEG	NEG	921
28	POS	Equivoque	NEG	NEG	378
29	POS	Equivoque	NEG	NEG	215
30	NEG	POS	NEG	NEG	> 1500
31	NEG	POS	NEG	NEG	> 1500
32	NEG	POS	NEG	NEG	> 1500
33	NEG	NEG	NEG	POS	313
34	NEG	NEG	NEG	NEG	113
35	NEG	NEG	NEG	NEG	120
36	NEG	NEG	NEG	NEG	125
37	NEG	NEG	NEG	NEG	127
38	NEG	NEG	NEG	NEG	141
39	NEG	NEG	NEG	NEG	148
40	NEG	NEG	NEG	NEG	152
41	NEG	NEG	NEG	NEG	163
42	NEG	NEG	NEG	NEG	164
43	NEG	NEG	NEG	NEG	165
44	NEG	NEG	NEG	NEG	173
45	NEG	NEG	NEG	NEG	176
46	NEG	NEG	NEG	NEG	192
47	NEG	NEG	NEG	NEG	201
48	NEG	NEG	NEG	NEG	209
49	NEG	NEG	NEG	NEG	237
50	NEG	NEG	NEG	NEG	268
51	NEG	NEG	NEG	NEG	282
52	NEG	NEG	NEG	NEG	289
53	NEG	NEG	NEG	NEG	311
54	NEG	NEG	NEG	NEG	357
55	NEG	NEG	NEG	NEG	383
56	NEG	NEG	NEG	NEG	415
57	NEG	NEG	NEG	NEG	429
58	NEG	NEG	NEG	NEG	474
59	NEG	NEG	NEG	NEG	483
60	NEG	NEG	NEG	NEG	545
61	NEG	NEG	NEG	NEG	1140
62	NEG	NEG	NEG	NEG	> 1500

**Tableau 23** : Résultats du dosage des anticorps anti-FI avec les 4 techniques testées et de la vitamine B12 avec le DxI® pour les 62 patients étudiés.



Il semblerait donc que les résultats obtenus avec le DxI®, le technique Bioadvance® et la technique Aeskulisa® concordent plus entre eux qu'avec ceux obtenus avec la technique Diasorin®.

Afin d'essayer de déterminer quelle technique se rapproche le plus de la clinique, les dossiers médicaux des patients pour lesquels les résultats discordent suivant la technique de dosage ont été consultés.

Parmi les **16 patients** positifs avec Diasorin® et négatifs avec les trois autres techniques, **8 patients** (patients N° 16, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 29 sur le tableau 23) ont une maladie de Biermer étiquetées (atrophie fundique à la fibroscopie gastrique ou dans le cas où la biopsie n'a pas été réalisée signes hématologiques évocateurs associés à une carence en vitamine B12 sans carence en folates), et **5 patients** (patients N° 14, 15, 17, 24 et 26) ont une maladie de Biermer fortement suspectée (carence en vitamine B12 parfois profonde, confirmée et corrigée après vitaminothérapie par voie intramusculaire). Pour les **3 autres patients** (patients N° 18, 25 et 27), le diagnostic de la maladie de Biermer est beaucoup plus délicat et ne repose que sur des suppositions. Les **patients 25 et 27** peuvent être considérés comme à risque compte tenu de la présence d'un terrain autoimmun (vascularite autoimmune pour l'un, positivité des anticorps anti-transglutaminase pour l'autre), quant au **patient 18** les signes neurologiques et la carence en vitamine B12 sont en faveur d'une maladie de Biermer malgré des anticorps anti-cellules pariétales négatifs.

Pour la forte majorité des ces patients les résultats obtenus avec la technique Diasorin® sembleraient en accord avec la clinique. A noter que pour deux de ces patients (patients N° 28 et 29) les résultats des anticorps anti-FI ont été trouvés ambigus avec le DxI®.

Le **patient 12** trouvé positif avec le DxI®, Diasorin® et Bioadvance®, et le **patient 13** trouvé positif avec le DxI® et Diasorin® s'avèrent être également des patients porteurs de la maladie de Biermer.

Enfin, les **3 patients** (N° 30, 31, 32) trouvés uniquement positifs avec le DxI® et le **patient** (patient N° 33) trouvé uniquement positif avec la technique Aeskulisa® ont une maladie de Biermer connue et traitée. La clinique semble donc dans ces cas là plutôt en faveur du DxI® ou de la technique Aeskulisa® que de la technique Diasorin®.

	Aeskulisa®	Bioadvance®	DiaSorin®	DxI®
Aeskulisa®		0,90	0,36	0,66*
Bioadvance®	0,90		0,43	0,74*
DiaSorin®	0,36	0,43		0,39*
DxI®	0,66*	0,74*	0,39*	

\* en prenant en considération les deux résultats ambigus avec le DxI®

**Tableau 24** : Valeurs de Kappa (k) obtenues : tableau de concordance diagnostique.

*Interprétation des valeurs de k*

**k < 0,20 : très faible concordance**

**0,21 < k < 0,40 : faible concordance**

**0,41 < k < 0,60 : moyenne concordance**

**0,61 < k < 0,80 : bonne concordance**

**0,81 < k < 1 : très bonne concordance**

#### IV.2.4- Discussion

Selon la technique de dosage utilisée, les résultats observés diffèrent. Ces différences pourraient s'expliquer par une période de congélation des sérums (- 20° C de 3 mois à 3 ans) ayant affecté la qualité de l'analyte à doser. Cette hypothèse d'ordre préanalytique ne semble pas valable car selon la littérature, les anticorps anti-facteur intrinsèque stockés à - 20°C sont stables pendant 4 à 15 ans selon les auteurs (64, 84) sans aucun effet des cycles de congélation et décongélation.

Au plan analytique les différentes techniques de dosage des anticorps anti-FI ne reposent pas sur le même principe, le DxI® utilise une technique par compétition alors que les méthodes ELISA reposent sur des techniques sandwich. D'autre part, les anticorps détectés par chacune des techniques ne sont pas identiques. Les trois techniques ELISA détectent les anticorps de type I et II, alors que le DxI® ne détecte que les anticorps de type I.

Même si les techniques ELISA mises en oeuvre reconnaissent les deux types d'anticorps, il semble peu probable que les anticorps dosés soient identiques compte tenu du fait que le facteur intrinsèque utilisé comme antigène cible dans la réaction n'est pas de même nature (origine porcine pour ELISA DiaSorin® et Bioadvance® et recombinant humain pour ELISA Aeskulisa®).

Enfin, il n'y a pas de standardisation des calibrateurs, ce qui pose la question de la validité d'une comparaison des résultats entre les trousse.

Si on considère les sérums discordants **positifs DiaSorin®/ négatifs DxI®**, les résultats obtenus avec la technique DiaSorin®, semblent en accord avec la clinique. L'explication la plus probable serait que la technique ELISA détecte en plus des anticorps de type I, les anticorps de type II. Ces anticorps semblant plus fréquents comme il l'a déjà été rapporté dans une précédente étude (54). Devant cette constatation, il semblerait donc préférable d'utiliser une technique qui détecte les deux types d'anticorps. Cependant, ces sérums ont également été trouvés négatifs avec la technique Bioadvance® et la technique Aeskulisa®, deux techniques qui détectent les deux types d'anticorps. L'hypothèse de la détection supplémentaire des anticorps de type II par la technique Diasorin® par rapport au DxI® pour expliquer les discordances observées semble donc remise en cause. Une meilleure sensibilité de la technique ELISA Diasorin® par rapport aux autres techniques pour la détection des anticorps de type I et/ou de type II peut alors être envisagée pour expliquer ces discordances.



En ce qui concerne les sérums discordants **négatifs ELISA DiaSorin®-Bioadvance®-Aeskulisa®/positifs DxI®**, les résultats obtenus avec le DxI® semblent cette fois en accord avec la clinique. Ce résultat nous amène à évoquer une meilleure sensibilité du DxI® pour la détection des anticorps de type I. Il faudrait néanmoins éliminer une interférence potentielle de concentrations très élevées de vitamine B12 (supérieures à 1500 pg/ml) laissant supposer que les patients auraient bénéficié d'une injection de vitamine B12, et seraient donc des « faux positifs » pour le dosage des anticorps anti-FI. L'interférence évoquée ici ne semble cependant pas constante. En effet pour un patient (patient N°62) avec une concentration en vitamine B12 augmentée les anticorps anti-FI ont été retrouvés négatifs avec le DxI®. Il aurait été intéressant afin de valider ce résultat et donc d'éliminer un faux positif de disposer d'un sérum prélevé à distance de l'injection de vitamine B12, chose qui n'a pas pu être réalisée en raison du caractère rétrospectif de cette étude.

S'il était confirmé que pour la détection de anticorps de type I, le DxI® était plus sensible que les autres techniques, il pourrait être judicieux d'utiliser deux techniques complémentaires, en terme de sensibilité et de spécificité, pour le dosage des anticorps anti-FI comme cela est fait pour certains paramètres infectieux notamment (HIV, syphilis).

En ce qui concerne le sérum discordant **positif DxI®-Diasorin®/négatif Bioadvance®-Aeskulisa®**, les résultats obtenus avec le DxI® et avec Diasorin® semblent en accord avec la clinique puisque ce patient est connu pour avoir une maladie de Biermer. Si l'on considère que le DxI® ne détecte que les anticorps de type I, il semblerait que le DxI® et la technique Diasorin® aient une sensibilité proche pour détecter ce type d'anticorps anti-FI par rapport aux deux autres techniques. Cette hypothèse a d'autant plus de poids si l'on admet comme positifs les deux patients trouvés équivoques avec le DxI®, positifs avec Diasorin® et négatifs avec les deux autres techniques.

En ce qui concerne le résultat discordant **positif Diasorin®-DxI®-Bioadvance®/négatif Aeskulisa®** et le résultat discordant **négatif Diasorin®-DxI®-Bioadvance®/positif Aeskulisa®** la nature du facteur intrinsèque peut ici être évoquée, la technique Aeskulisa® étant la seule technique à utiliser du facteur intrinsèque recombinant humain. On peut supposer qu'au plan pathogénique il existerait des sous populations d'anticorps anti-FI de type I et/ou de type II, certaines mieux reconnues que d'autres par du facteur intrinsèque recombinant humain ce qui expliquerait les différences observées entre les 3 trousseaux ELISA testés reposant pourtant sur le même principe de dosage.



A l'issue de l'analyse de nos résultats, il semblerait que la technique la plus adaptée soit la technique Diasorin® car en plus de détecter les deux spécificités d'anticorps anti-facteur intrinsèque, elle semblerait avoir une sensibilité optimale si on considère les patients étiquetés biermériens trouvés positifs uniquement avec cette technique. Compte tenu du fait que d'autres patients également connus pour maladie de Biermer ont été trouvés positifs uniquement avec le Dxi® ou la technique Aeskulisa®, il conviendrait alors d'associer une de ces deux techniques à celle de Diasorin®. Malgré ces observations nous sommes dans l'impossibilité de dire quelle technique est juste car pour un certain nombre de patients le diagnostic de la maladie de Biermer n'a été que fortement suspecté en l'absence du résultat de la fibroscopie gastrique considérée comme le gold standard pour le diagnostic de cette pathologie. Néanmoins, il apparaît qu'il existe un problème évident pour le dosage de ces autoanticorps, ce qui remet en cause la place privilégiée de cet examen malgré son caractère non invasif dans le diagnostic, délicat, de la maladie de Biermer, d'autant plus rappelons le qu'un résultat négatif n'exclut pas cette maladie. Compte tenu du risque de séquelles neurologiques et du risque accru de cancer digestif chez ces patients, la biopsie gastrique en première intention semblerait peut être justifiée, à moins que le tubage gastrique ne se développe, ou qu'un « nouveau » test de Schilling assurant une sécurité infectieuse optimale en utilisant du facteur intrinsèque recombinant humain et non porcin n'apparaisse.

## CRITERES BIOLOGIQUES DEFINISSANT LES QUATRE GROUPES ETUDIES:

### SUJETS HYPOTHYROÏDIENS : TSH > 5 mUI/l (N = 121, 91♀/30♂)

- **autoimmuns:**                   \* anti- TPO > 500 U/ml  
                                      \* ± anti-Tg > 60 U/ml

→ *groupe TSH élevée et TPO élevées*  
(N=55, 47♀/8♂, âge médian : 52 ans, extrêmes : 2 mois à 98 ans)

- **non autoimmuns :**           \* anti-TPO < 60 U/ml  
                                      \* anti-Tg < 60 U/ml

→ *groupe TSH élevée et TPO indétectables*  
(N=66, 44♀/22♂, âge médian : 56 ans, extrêmes : 20 à 90 ans)

### SUJETS HYPERTHYROÏDIENS : TSH < 0,15 mUI/l (N = 105,74♀/31♂)

- **autoimmuns :**                   \* anti-RTSH > 5 IU/l (valeur seuil 1,5 IU/l)  
                                      \* ± anti-TPO > 60 U/ml  
                                      \* ± anti-Tg > 60U/ml

→ *groupe TSH basse et anti-RTSH élevés*  
(N=58, 45♀/13♂, âge médian : 45 ans, extrêmes : 16 ans à 88 ans)

- **non autoimmuns :**           \* anti-RTSH < 1,5 IU/l  
                                      \* anti-TPO < 60 U/ml  
                                      \* ± anti-Tg < 60 U/ml

→ *groupe TSH basse et anti-RTSH indétectables*  
(N=47, 29♀/18♂, âge médian : 64ans, extrêmes : 27 à 94 ans)



## **V- ETUDE CLINICOBIOLOGIQUE**

### **V.1- Objectifs**

Les maladies thyroïdiennes autoimmunes sont fréquentes dans la population générale, estimées à environ 5 à 10% (85). De nombreuses publications ont souligné l'association fréquente (13,7%) (85), en raison de mécanismes immunopathologiques communs, des dysthyroïdies autoimmunes à d'autres pathologies autoimmunes spécifiques d'organes ou systémiques parmi lesquelles : le diabète de type I, le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Gougerot-Sjögren, le vitiligo, et la maladie de Biermer (85, 86, 87).

Nous avons ciblé notre étude sur l'association de la dysimmunité thyroïdienne à la maladie de Biermer. Dans cet objectif, cette étude rétrospective a consisté à déterminer la prévalence des anticorps anti-facteur intrinsèque chez des patients présentant des signes biologiques de dysthyroïdies autoimmunes et de dysthyroïdies non autoimmunes afin de souligner l'importance de la dysimmunité dans le développement de la maladie de Biermer.

### **V.2- Patients et méthode**

En se basant sur environ un an de sérothèque (mai 2005 à juin 2006), nous avons sélectionné rétrospectivement les sérums de 226 patients ayant bénéficié d'un bilan biologique thyroïdien.

Ces sérums ont été sélectionnés sur des critères purement biologiques de dysthyroïdies : résultat du dosage de la TSH, et résultat du dosage des anticorps anti-thyroïdiens (anti-TPO, anti-Tg, et anti-RTSH). Ces dosages ont été réalisés par les techniques radioimmunologiques utilisées en routine au laboratoire et précédemment décrites dans l'étude analytique. En ce qui concerne le dosage des anticorps anti-RTSH, non étudié dans la partie analytique, il repose sur l'inhibition de la liaison de la TSH radiomarquée à son récepteur spécifique, et est réalisé avec la technique BRAHMS® utilisant comme récepteur de la TSH un récepteur recombinant humain (88). La plupart des patients a également bénéficié d'un dosage des hormones libres (T4l ± T3l) par la technique RIA du laboratoire.

Les patients (N=226) choisis se répartissent en deux groupes suivant le résultat du dosage de la TSH : le groupe des patients hyperthyroïdiens (TSH < 0,15 mUI/l) et le groupe des

Groupe hypothyroïdien autoimmun	TSH en mUI/l			T4l en pmol/l			T3l en pmol/l			Vitamine B12 en pg/ml		
	med	min	max	med	min	max	med	min	max	med	min	max
RIA ou IRMA	9	5	229,2	13,9	3,1	18,3	3,3	2	4,3			
Dxl®	6,6	2,8	66,3	9,5	1,2	14,1	4,6	2,2	6,3	368	153	1466
Groupe hypothyroïdien non autoimmun	6,6	5	369	14,8	4,2	30	3,5	1,9	9,8			
	4,9	3	28	11	4,6	37	4,8	2,4	10	316	122	1474

med : valeur médiane, min : valeur minimale, max : valeur maximale

**Tableau 25** : Valeurs médianes, minimales et maximales de la TSH, T4l, T3l et vitamine B12 en fonction des techniques chez les hypothyroïdiens

Groupe hypothyroïdien autoimmun	TSH en mUI/l			T4l en pmol/l			T3l en pmol/l			Vitamine B12 en pg/ml		
	med	min	max	med	min	max	med	min	max	med	min	max
RIA ou IRMA	0,09	0,08	0,09	33	10,4	43,9	11,9	4	31,5			
Dxl®	0,01	0,01	0,17	41,3	7,4	69,7	11,5	4,6	34,9	386	96	872
Groupe hypothyroïdien non autoimmun	0,1	0,07	0,13	21,4	12,7	36,8	5	2,4	29,2			
	0,03	0,01	0,47	18,5	10,5	64	5,3	3,2	15,8	315	116	1023

**Tableau 26** : Valeurs médianes, minimales et maximales de la TSH, T4l, T3l et vitamine B12 en fonction des techniques chez les hyperthyroïdiens

patients hypothyroïdiens (TSH > 5 mUI/l). Chaque groupe se divisant en deux sous groupes suivant la positivité de certains anticorps anti-thyroïdiens.

La positivité des anticorps anti-RTSH permet de distinguer les sujets hyperthyroïdiens autoimmuns (probablement porteurs d'une maladie de Basedow) des sujets hyperthyroïdiens non autoimmuns.

La positivité des anticorps anti-TPO permet de distinguer les sujets hypothyroïdiens autoimmuns (probablement porteurs d'une maladie de Hashimoto ou autres thyroïdites autoimmunes) des sujets hypothyroïdiens non autoimmuns.

Les critères biologiques d'inclusion choisis dans cette étude ainsi que les caractéristiques de chacun des groupes sont précisés sur la page précédente.

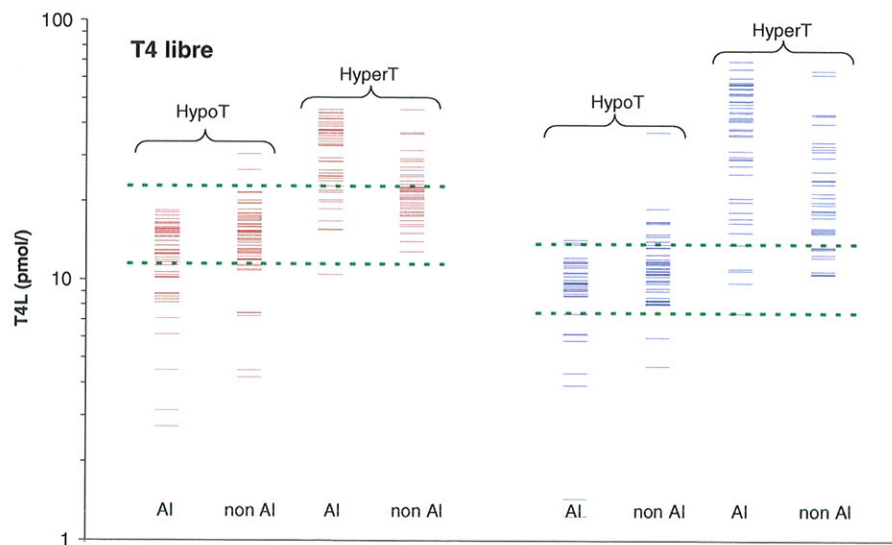
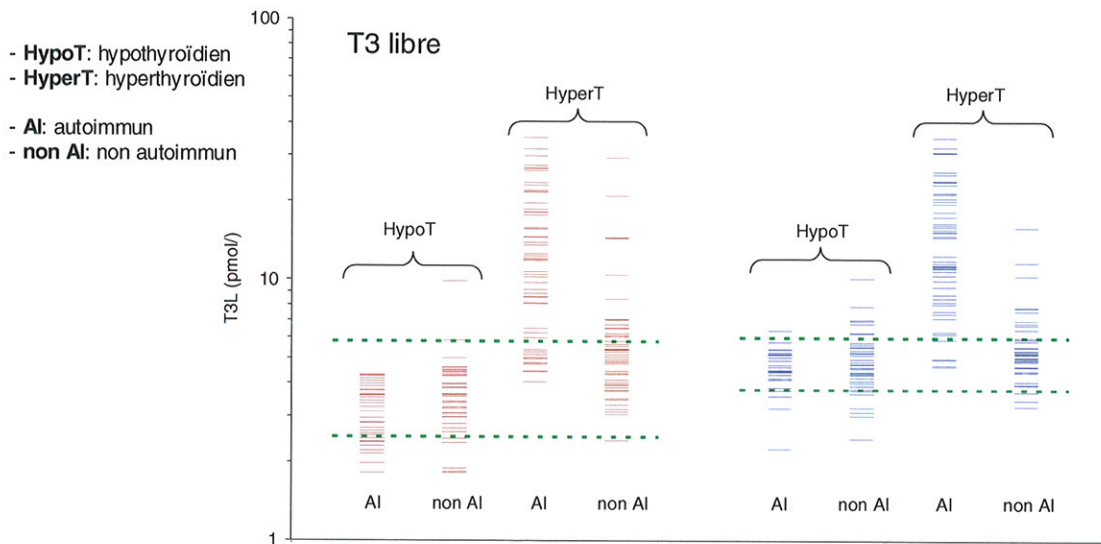
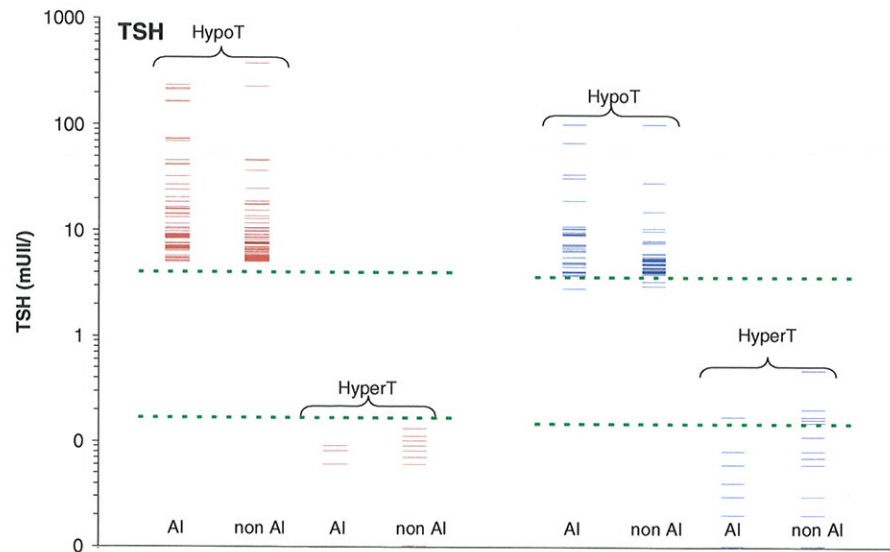
Pour l'ensemble des sérums, ont été dosés sur le DxI® en priorité les anticorps anti-facteur intrinsèque et la vitamine B12 et quand la quantité de sérum le permettait différents paramètres du bilan biologique thyroïdien (TSH, T4l, T3l et anti-TPO).

### V.3- Résultats

Pour le dosage de la TSH, de la T4l, de la T3l et de la vitamine B12 les valeurs médianes, minimales et maximales sont présentées dans le **Tableau 25** pour les sujets « biologiquement » hypothyroïdiens et dans le **Tableau 26** pour les sujets « biologiquement » hyperthyroïdiens.

En accord avec les résultats de l'étude analytique, il existe des relations linéaires statistiquement significatives ( $p < 0,0001$ ) entre les valeurs obtenues avec le DxI® et les techniques radioimmunologiques pour les dosages de la TSH, de la T4l et de la T3l et ce au sein de chaque groupe. L'ensemble des valeurs obtenues pour ces trois paramètres avec les deux techniques et pour les 4 groupes est représenté graphiquement (**Figure 20**).

Malgré une relation étroite entre les résultats, les discordances observées entre les deux techniques au cours de l'étude analytique pour les différents paramètres du bilan thyroïdien se confirment en particulier pour la TSH. En effet, certains patients classés dysthyroïdiens (hyperthyroïdiens ou hypothyroïdiens) avec la technique IRMA sont classés euthyroïdiens avec le DxI®. La concentration de TSH ayant constitué l'élément de base de notre recrutement, il est clair que certains patients sélectionnés dans les circonstances de notre étude ne l'auraient pas été si nous nous étions basés sur des concentrations de TSH données par le DxI®.



**Figure 20:** Valeurs de TSH, T4l, et T3l obtenues pour chacun des groupes avec les méthodes du laboratoire (-) et le DxI® (-).

Si on compare les résultats obtenus chez les sujets dysthyroïdiens autoimmuns et chez les sujets dysthyroïdiens non autoimmuns avec la technique RIA (*Figure 20*) :

- il existe une différence statistiquement significative des valeurs de T4I ( $p < 0,005$ ) et de T3I ( $p < 0,05$ ) entre hypothyroïdiens autoimmuns et hypothyroïdiens non autoimmuns, les valeurs de T4I et de T3I étant plus élevées chez les hypothyroïdiens non autoimmuns que chez les hypothyroïdiens autoimmuns ;

- il existe également une différence statistiquement significative des valeurs de T4I ( $p < 0,0001$ ) et de T3I ( $p < 0,0001$ ) entre hyperthyroïdiens autoimmuns et hyperthyroïdiens non autoimmuns, les valeurs de T4I et de T3I étant plus élevées chez les hyperthyroïdiens autoimmuns que chez les hyperthyroïdiens non autoimmuns.

Si on s'intéresse maintenant aux résultats du dosage de la vitamine B12, la proportion de patients présentant une carence en vitamine B12 est statistiquement plus importante ( $p < 0,05$ ) chez les hyperthyroïdiens que chez les hypothyroïdiens toutes étiologies confondues.

En ce qui concerne les anticorps anti-facteur intrinsèque, ils ont été trouvés équivoques pour un patient (groupe hypothyroïdien autoimmun), et supérieurs au seuil de discrimination pour trois patients: 1 issu du groupe TSH basse et anti-RTSH élevés (hyperthyroïdiens autoimmuns), et 2 issus du groupe TSH élevée et anti-TPO élevés (hypothyroïdiens autoimmuns) pour deux d'entre eux le résultat a pu être contrôlé sur un autre prélèvement, et s'est confirmé.

Le test de  $\chi^2$  met en évidence que les résultats du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque diffèrent statistiquement ( $p < 0,05$ ) entre les sujets dysthyroïdiens autoimmuns et les sujets dysthyroïdiens non autoimmuns, ce qui souligne la prédisposition des sujets autoimmuns à développer ces autoanticorps donc probablement une maladie de Biermer.

L'ensemble des résultats obtenus pour ces quatre patients figure dans le *Tableau 27*.

Si on se base sur les résultats obtenus avec le DxI® et considère comme positif le résultat équivoque, la prévalence des anticorps anti-FI chez les dysthyroïdiens autoimmuns est donc de 3,5% (4/113). Afin de déterminer la validité clinique des résultats du dosage des anticorps anti-FI, et d'éliminer des faux positifs (3 patients ont une concentration en vitamine B12 supérieure à 440 pg/ml), les dossiers cliniques de ces quatre patients ont été consultés.

Groupe	TSH en mUI/l	T4l en pmol/l		T3l en pmol/l		Vit B12 en pmol/l	AC anti-FI		
		IRMA	DxI®	RIA	DxI®			RIA	DxI®
Groupe Hyperthyroïdie Autoimmune	Patient 1 : ♂, 58 ans	< 0,06	0,01	QI	52,4	12,3	11	529	19,9
	Patient 2 : ♀, 73 ans	< 0,06	0,01	37,7	44,6	11,8	12,3	872	35,2
Groupe Hypothyroïdie Autoimmune	Patient 3 : ♀, 23 ans	6	5	QI	10	QI	5,4	153	1,5
	Patient 4 : ♀, 51 ans	5	4	15,8	11,8	4,2	5,1	477	9,2

QI : quantité insuffisante

**Tableau 27 :** Résultats de la TSH, T4l, T3l avec les techniques radioimmunologiques et le DxI®, de la vitamine B12 avec le DxI® chez les quatre patients dont les anticorps anti-facteur intrinsèque ont été trouvés supérieurs au seuil de discrimination avec le DxI®.

	AC anti-FI DxI®	AC anti-FI ELISA DiaSorin®	AC anti-FI ELISA Bioadvance®	AC anti-FI ELISA Aeskulisa®
<i>Patient 1</i>	<b>POSITIF</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>POSITIF</b>
<i>Patient 1 contrôle</i>	<b>POSITIF</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>POSITIF</b>
<i>Patient 2</i>	<b>POSITIF</b>	<b>POSITIF</b>	<b>POSITIF</b>	<b>POSITIF</b>
<i>Patient 2 contrôle</i>	<b>POSITIF</b>	<b>POSITIF</b>	<b>POSITIF</b>	<b>POSITIF</b>
<i>Patient 3</i>	<b>EQUIVOQUE</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>NEGATIF</b>
<i>Patient 4</i>	<b>POSITIF</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>NEGATIF</b>	<b>NEGATIF</b>

**Tableau 28 :** Concordance diagnostique des anticorps anti-facteur intrinsèque avec les différentes techniques pour les 4 patients trouvés positifs avec la technique du DxI®.

Pour deux patients, patient 2 et 4 la maladie de Biermer est connue et traitée depuis plusieurs années et est associée pour le patient 2 à une maladie de Basedow et pour le patient 4 à une thyroïdite de Hashimoto. Pour les deux autres patients la maladie de Biermer n'est pas étiquetée mais le diagnostic est probable compte tenu de l'existence d'un terrain autoimmun personnel et familial et de certains signes biologiques évocateurs. Le patient 1 est porteur d'une maladie de Basedow avec un contexte familial de dysthyroïdie autoimmune, sur le plan biologique on note la positivité des anticorps antinucléaires et des anticorps anti-cellules pariétales. Pour le patient 3, le dosage des anticorps anti-FI s'est avéré équivoque avec une concentration en vitamine B12 basse à 153 pg/ml (valeurs normales : 180 à 914 pg/ml). Ce patient est diabétique de type I, a une thyroïdite de Hashimoto et un vitiligo, de plus on note la présence d'un terrain autoimmun familial important avec une mère diabétique de type I, présentant une hypothyroïdie autoimmune et une insuffisance surrénalienne et une sœur présentant également une hypothyroïdie autoimmune et une insuffisance surrénalienne. Pour ces deux patients la positivité de ces autoanticorps peut donc se justifier : terrain autoimmun personnel, positivité des anticorps anti-cellules pariétales pour le patient 1 et carence en vitamine B12 pour le patient 3. Les résultats positifs obtenus avec le DxI® semblent donc en accord avec la clinique, et non liés à un problème d'interférence.

L'étude analytique a montré qu'il existait des discordances importantes suivant la technique de dosage utilisée (DxI®, ELISA Diasorin®, ELISA Bioadvance®, ELISA Aeskulisa®) pour cela, les sérums trouvés positifs avec le DxI® ont été testés avec les trois autres techniques ELISA décrites précédemment.

La concordance diagnostique en fonction de la technique utilisée figure dans le **Tableau 28**. Les quatre techniques concordent pour un seul patient (patient 2). Pour le **patient 1**, le DxI® et la technique ELISA Aeskulisa® concordent alors que pour les **patients 3 et 4** seul le DxI® donne des anticorps anti-FI positifs. Les discordances diagnostiques constatées au cours de l'étude analytique se confirment donc.





## V.4- Discussion

Les anticorps anti-facteur intrinsèque se sont révélés supérieurs au seuil de discrimination avec le DxI® chez 4 patients porteurs de pathologies thyroïdiennes autoimmunes. Les résultats obtenus avec le DxI® semblent en accord avec la clinique puisque pour deux patients le diagnostic de la maladie de Biermer est certain et pour les deux autres il est probable compte tenu de l'existence d'un terrain autoimmun personnel et familial. L'hypothèse précédemment émise, dans l'étude analytique, quant à la plus grande sensibilité du DxI®, par rapport aux techniques ELISA testées, pour la détection des anticorps de type I semble se confirmer. Comme vu dans l'étude analytique des patients connus pour avoir une maladie de Biermer possédant des concentrations en vitamine B12 pouvant interférer sur le dosage ont eu des anticorps anti-facteur intrinsèque positifs uniquement avec le DxI® ce qui nous conduit à nous demander si dans certaines circonstances une concentration élevée en vitamine B12 ne sensibiliserait pas le dosage. Les discordances entre les trois techniques ELISA perdurent également.

Si l'on se base sur les résultats obtenus avec le DxI®, on obtient une prévalence des anticorps anti-FI de 3,5% chez les patients dysthyroïdiens à composante autoimmune. Des cas isolés ou familiaux de maladie de Biermer associée à d'autres pathologies autoimmunes ont été rapportés (85, 87) mais seulement deux études se sont intéressées à la prévalence des anticorps anti-facteur intrinsèque chez des sujets porteurs de pathologies autoimmunes. La première étude a mis en évidence une prévalence de 16% chez les dysthyroïdiens autoimmuns, et la deuxième étude une prévalence de 6,3% chez des individus associant diabète de type I et dysthyroïdie autoimmune par rapport à une prévalence de 4% chez les sujets seulement diabétiques de type I. Suivant les études, la prévalence de ces autoanticorps varie. Cette variabilité pouvant s'expliquer par un problème de recrutement ou par l'utilisation de trousse de dosage différentes. Il semble probable d'après les résultats de l'étude analytique que la prévalence des anticorps anti-FI dans notre population ciblée aurait été différente si nous avions utilisé comme technique de dépistage une des techniques ELISA mentionnées. D'après les résultats de l'étude analytique, il semblerait qu'avec la technique Diasorin® la prévalence aurait été plus élevée si on considère que cette technique présente une bonne sensibilité pour le dosage des anticorps anti-FI de type I et qu'elle détecte en plus par rapport au DxI® les anticorps de type II. Avec les techniques Bioadvance® et Aeskulisa®, la prévalence aurait été similaire voire plus basse si l'on considère les quelques



patients porteurs de maladie de Biermer et pour lesquels les anticorps anti-TI se sont avérés positifs avec le DxI® et négatifs avec Bioadvance® et Aeskulisa®.

Sur le plan épidémiologique, cette étude rétrospective montre clairement que les sujets présentant une dysthyroïdie auto-immune ont plus de risque de développer une maladie de Biermer que les sujets dysthyroïdiens non auto-immuns. Le dépistage de cette maladie chez ces sujets prédisposés semble donc justifié.



## **DISCUSSION - CONCLUSION**



L'objectif de ce travail a été d'étudier l'autoimmunité gastrique par le dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque chez des patients porteurs de maladies thyroïdiennes autoimmunes, dans le cadre de l'évaluation d'un automate multiparamétrique de chimiluminescence : l'UniCel DxI 800®.

Au plan analytique, nous rapportons des discordances nettes entre les résultats obtenus avec les techniques utilisées et ce pour l'ensemble des paramètres étudiés : TSH, T4I, T3I, anticorps anti-TPO, anticorps anti-Tg, et anticorps anti-facteur intrinsèque.

En ce qui concerne le bilan biologique thyroïdien standard, les différences concernent plus le dosage des hormones libres que le dosage de la TSH. Ces discordances ont pour conséquences d'affecter l'exploration diagnostique de première et de deuxième intention, certains patients passant du statut d'euthyroïdien au statut de dysthyroïdien suivant la technique de dosage utilisée, et de compliquer un suivi thérapeutique déjà délicat. L'ensemble des discordances ne semblant pas être lié à un problème analytique, compte tenu de la bonne corrélation mathématique existant entre les techniques et des bons résultats des tests de précision, mais à un problème de valeurs de référence qui ne semblent pas adaptées. Une réévaluation de ces valeurs semblent donc être nécessaire pour le DxI® si on considère que les techniques radioimmunologiques se rapprochent le plus de la technique de référence.

En ce qui concerne les anticorps anti-thyroïdiens, les discordances entre les deux techniques testées n'auront pas le même impact suivant le contexte de prescription du dosage de ces autoanticorps. Lorsque les anticorps anti-TPO et anticorps anti-Tg sont demandés dans le but d'établir un diagnostic étiologique les discordances observées sont sans conséquence pratique. Ces discordances sont plus préoccupantes lorsque le dosage des anticorps anti-Tg s'inscrit dans la surveillance des cancers différenciés de la thyroïde. Les seuils de discrimination établis pour chacune des techniques semblent à l'origine des différences observées.

La concentration de la TSH, et des anticorps anti-thyroïdiens établies avec les techniques du laboratoire ayant constitué les critères de recrutement de notre étude clinicobiologique, il apparaît clairement que certains patients sélectionnés ne l'auraient pas été si nous nous étions basés sur les résultats obtenus avec le DxI®.

Sur l'ensemble des paramètres testés, c'est cependant avec les anticorps anti-facteur intrinsèque que les discordances entre les techniques testées semblent les plus importantes remettant en cause la place apparemment privilégiée du dosage de ces autoanticorps, dans le





diagnostic de la maladie de Biermer. La nature des anticorps détectés ainsi que la sensibilité de la technique semblant en cause.

Au plan épidémiologique, la prévalence des anticorps anti-facteur intrinsèque est d'après notre étude plus importante chez les sujets dysthyroïdiens autoimmuns que chez les sujets dysthyroïdiens non autoimmuns. Ces individus auraient donc plus de risque de développer une maladie de Biermer. La maladie de Biermer, bien que de traitement aisé, n'est pas dénuée de gravité si l'on considère le caractère irréversible de certains troubles neurologiques et son implication dans l'apparition de lésions néoplasiques intestinales. Il semblerait donc justifié de la dépister chez les patients à risque. Se pose alors la question de l'outil de diagnostic. Notre étude a souligné qu'il existe un problème diagnostique évident, qui se retrouve dans la littérature lorsqu'on voit la diversité des critères diagnostiques des études sur la maladie de Biermer. Sur l'ensemble des études réalisées, trois se sont attachées à évaluer particulièrement l'association de la maladie de Biermer à d'autres maladies autoimmunes : 2 aux maladies thyroïdiennes autoimmunes (89, 90) et une au diabète de type I associé à des maladies thyroïdiennes autoimmunes (86). La première étude se base sur l'association hypergastrinémie, atrophie fundique, anémie macrocytaire et positivité des anticorps anti-facteur intrinsèque, la deuxième sur l'association carence en vitamine B12, hypergastrinémie et atrophie fundique alors que la troisième étude est plus restrictive se basant sur l'association carence en vitamine B12, positivité des anticorps anti-facteur intrinsèque. Afin de déterminer la place réelle des anticorps anti-FI dans le diagnostic de cette pathologie, il serait utile de mener une étude prospective en collaboration avec les services cliniques les plus susceptibles de diagnostiquer une maladie de Biermer : gastroentérologie, neurologie et hématologie. Tout patient issu de ces services présentant des signes évocateurs de la maladie de Biermer (atrophie fundique, neuropathie profonde, anémie macrocytaire avec signes de carence vitaminique) pourrait bénéficier d'un dosage de la vitamine B12, de gastrine, des anticorps anti-facteur intrinsèque et des anticorps anti-cellules pariétales. Une hypergastrinémie orienterait vers le diagnostic d'atrophie fundique. L'association des deux autoanticorps permettrait d'associer une sensibilité et spécificité optimales. En raison des discordances décrites pour les dosages des anticorps anti-facteur intrinsèque en fonction des techniques il serait peut être utile de doser ces anticorps avec deux techniques distinctes. La confrontation des résultats biologiques à la clinique et au résultat de la biopsie gastrique permettrait de clarifier les performances des différentes techniques de dosages. En cas de discordances clinicobiologiques et en l'absence de biopsie gastrique elle pourrait être envisagée et permettrait en dernier recours de trancher quant à la supériorité diagnostique d'un examen



biologique par rapport à un autre. En plus d'établir une démarche diagnostique consensuelle pour la maladie de Biermer on pourrait envisager par l'intermédiaire d'une telle étude d'améliorer les connaissances quant à la cinétique des autoanticorps au cours de la maladie de Biermer. Pour cela, il pourrait être envisagé de doser régulièrement chez les patients biermériens les anticorps anti-facteur intrinsèque et anticorps anti-cellules pariétales afin de confirmer que l'incidence des anticorps anti-cellules pariétales diminue au cours de l'évolution de la maladie alors que l'incidence des anticorps anti-facteur reste stable (91).

Enfin, s'il existait une démarche diagnostique consensuelle pour la maladie de Biermer, une étude épidémiologique de référence serait utile afin d'évaluer la prédisposition des individus porteurs de maladies autoimmunes à développer la maladie de Biermer.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Carayon P, Niccoli-Sire P, Lejeune PJ, et al.** Recommandations de consensus sur le diagnostic et la surveillance des maladies de la glande thyroïde. 2002 Ann Biol Clin (Paris) 60 : 331-338.
2. **Wemeau JL, D'Herbomez-Boidein M.** L'exploration biologique de la thyroïde : quels examens, pour quelles indications? 2005 Biotribune 14.: 30-34.
3. **Beck-Peccoz P, Bonomi M, Persani L.** Hormone thyroïdienne. 2005 Encycl.Med.Chir, Endocrinologie 2 : 140-147.
4. **Izembart M.** L'exploration de la thyroïde. 1999 Cahier de Formation : 75-100.
5. **Piketty M-L, Lancelin F, Poirier-Bègue E, et al.** Piège analytique en hormonologie thyroïdienne. 2000 Médecine thérapeutique / Endocrinologie 2 : 311-322.
6. **Sapin R, Schlienger J-L.** Dosage de la thyroxine (T4) et tri-iodothyronine (T3) : techniques et place dans le bilan thyroïdien fonctionnel. 2003 Annales de biologie clinique 61 : 411-420.
7. **Barbier Y.** 2001 Les pièges de l'hormonémie libre thyroïdienne. Formation continue ACOMEN, Lyon.
8. **Conte-Devolx B, Lejeune P-J, Ruf J, et al.** L'exploration biologique dans le diagnostic et la surveillance des maladies de la glande thyroïde. [www.nacb.org/lmpg/thyroid/thyroid\\_guidelines\\_francais.pdf](http://www.nacb.org/lmpg/thyroid/thyroid_guidelines_francais.pdf). Mise à jour 2002. Accédé en Août 2006.
9. **Léger A.** Exploration fonctionnelle de la glande thyroïde (en dehors de l'imagerie). 1999 Encycl.Med.Chir, Endocrinologie-Nutrition:1-5.
10. **Sapin R, Schlienger J-L.** Difficultés d'interprétation du bilan thyroïdien II pièges analytiques. 1999 Technique au quotidien revue de L'ACOMEN 2000.
11. **Nelson JC, Wilcox RB.** Analytical performances of free and total thyroxine assays. 1996 Clin Chem 42 : 146-154.
12. **Le Guillouzic D.** Le biologiste face aux pathologies thyroïdiennes: interprétation des bilans thyroïdiens. 2003 Revue française des laboratoires Supplément en N°349 : 27-30.
13. **Izembart M.** Réflexion sur les problèmes posés par le dosage des auto-anticorps thyroïdiens. 2001 Immunoanal Biol Spéc 16 : 350-352.
14. **Graulet A.** Informations réactifs: Anticorps anti-TPO. 2000 Immunoanal Biol Spéc 15 : 53-59.



15. **D'Herbomez M.** Exploration biologique de l'auto-immunité thyroïdienne. [www.biotribune.com/dossiers/biomédicaux](http://www.biotribune.com/dossiers/biomédicaux). Mise à jour inconnue. Accédé en Août 2006.
16. **Wémeau JL, Herbomez M.** Hypothyroïdie auto-immunes. 1998 Rev Prat 48 : 2006-2012.
17. **Mayer A, Orgiazzi J.** Auto-immunité et thyroïde. 2000 Encycl.Med.Chir, Endocrinologie-Nutrition 4 : 1-12.
18. **Haddow J, Palomaki G, Allan W, et al.** Maternal deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. 1999 N Engl J Med 341 (8) : 549-555.
19. **Gaillard O.** La thyroglobline. 2000 Immunoanal Biol Spéc 15 : 14-18.
20. **Graulet A.** Informations réactifs: anticorps anti-thyroglobuline et anticorps antirécepteurs de la TSH. 2000 Immunoanal Biol Spéc 15 : 129-138.
21. **Tomer Y, Greenberg D, Concepcion E, et al.** Thyroglobulin is a specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. 2002 J Clin Endocrinol Metab 87 : 404-407.
22. **Meyer O. RA, Youinou P.** 1999 Auto-anticorps, marqueurs des maladies auto-immunes.
23. **Issaly E.** 2001 La maladie de Basedow et autres maladies auto-immunes de la thyroïde: clinique, traitements, pathogénie et perspectives thérapeutiques. Université Paris V, Paris.
24. **Massart C.** Un nouveau dosage des anticorps anti-récepteur de la TSH: le TRAK humain. Intérêt diagnostique et pronostic dans la maladie de Basedow. 2002 Immunoanal Biol Spéc 1 : 26-32.
25. **Chrétien-Leprince P.** Thyroépathies auto-immunes. 2004 Revue française des laboratoires 361 : 8-10.
26. **ANAES.** Diagnostic et surveillance biologique de l'hypothyroïdie de l'adulte. 1999 Texte de recommandation.
27. **ANAES.** Diagnostic et surveillance biologique de l'hyperthyroïdie de l'adulte. 2000 Texte de recommandation.
28. Références médicales opposables. [www.epidaure.com](http://www.epidaure.com). Mise à jour Avril 1999. Accédé en Août 2006.
29. **Dayan C, Daniels G.** Chronic autoimmune thyroiditis. 1996 N Engl J Med 335 : 238-244.





30. **Duron F, Dubosclard E, Johanet C.** Thyroïdites. 2004 *Encycl.Med.Chir, Endocrinologie 1* : 3-18.
31. **Wémeau JL, D'Herbomez M, Perimenis P, et al.** Thyroïdite et grossesse. 2005 *Encycl.Med.Chir, Endocrinologie 2* : 105-120.
32. **Argémi B.** Exploration biologique de la fonction thyroïdienne. L'indispensable, le confortable, le superflu. 2000 *Revue de l'ACOMEN 6* : 15-21.
33. **Hancock S, Cox R, McDougall I.** Thyroid disease after treatment of Hodgkin's disease. 1991 *N Engl J Med 325* : 599-600.
34. **Vlaeoein-Guillem V, D'Herbomez-Boldein M, Delcoulx M, et al.** Apoptose et thyroïde: face à Fas. 2001 *Presse Med 30* : 74-80.
35. **Zittoun J.** Maladie de Biermer. 2001 *Rev Prat 51* : 1542-1546.
36. **Cadiot G.** Maladie de Biermer Quand évoquer le diagnostic ? Quels examens faut-il demander ? A quel moment doit-on prescrire une endoscopie et réaliser des biopsies dans le diagnostic et la surveillance? [www.fmcgastro.org](http://www.fmcgastro.org). Mise à jour 23/05/2006. Accédé en Août 2006.
37. **Carmel R.** Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. 1996 *Arch Intern Med 156* : 1097-1100.
38. **Carmel R, Johnson CS.** Racial patterns in pernicious anemia. Early age at onset and increased frequency of intrinsic-factor antibody in black women. 1978 *N Engl J Med 298* : 647-650.
39. **Toh BH, Alderuccio F.** Pernicious anaemia. 2004 *Autoimmunity 37* : 357-361.
40. **Cattan D.** Anémie d'origine digestive. 2005 *Encycl.Med.Chir, Hépatogastroentérologie 2* : 124-149.
41. **Zittoun J, Sultan C.** Le facteur intrinsèque. 1973 *Pathol Biol (Paris) 21* : 523-529.
42. **Loukili NH, Noel E, Blaison G, et al.** Données actuelles sur la maladie de Biermer. A propos d'une étude rétrospective de 49 observations. 2004 *Rev Med Interne 25* : 556-561.
43. **Epstein F.** Pernicious anemia. 1997 *N Engl J Med 20* : 1441-1448.
44. **Whitehead.R.** The classification of chronic gastritis : current status. 1995 *Journal of Clinical Gastroenterology 21* : 131-134.
45. **Stockbrugger B.** Serum gastrin and atrophy gastritis in achlorhydric patients with and without pernicious anemia. 1976 *Scand J Gastroenterol 11* : 1976.
46. **Tho BH, Van Driel I, Glesson P.** Pernicious anemia. 1997 *N Engl J Med 337* : 1441-1448.



47. **Andres E, Affenberger S, Vinzio S, et al.** Carences en vitamine B12 chez l'adulte : étiologies, manifestations cliniques et traitement. 2005 Rev Med Interne 26 : 938-946.
48. **Kaye MD.** Immunological aspect of gastritis and pernicious anaemia. 1987 Clin Gastroenterol 1 (3) : 487-506.
49. **Bergman MP, Amedei A, D'Elios MM, et al.** Characterization of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase T cell epitopes in human autoimmune gastritis. 2003 Eur J Immunol 33 : 539-545.
50. **Vargas JA, Alvarez-Mon L, Manzano L, et al.** Functional defect of T cells in autoimmune gastritis. 1995 Gut 36 : 171-175.
51. **Carmel R.** Reassessment of the relative prevalences of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. 1992 Clin Exp Immunol 89 : 74-77.
52. **Gueant JL, Safi A, Aimone-Gastin I, et al.** Autoantibodies in pernicious anemia type I patients recognize sequence 251-256 in human intrinsic factor. 1997 Proc Assoc Am Physicians 109 : 462-469.
53. **Bardhan KD, Hall JR, Spray GH, et al.** Blocking and binding autoantibody to intrinsic factor. 1968 Lancet 1 : 62-64.
54. **Waters HM, Dawson DW, Howarth JE, et al.** High incidence of type II autoantibodies in pernicious anaemia. 1993 J Clin Pathol 46 : 45-47.
55. **Cummins D, Ardeman S.** Intrinsic factor antibodies and pernicious anaemia. 1991 Lancet 338 : 383-384.
56. **Gueant JL.** Cobalamines. 1996 Encycl.Med.Chir, Endocrinologie-Nutrition 1 : 1-4.
57. **Zandecki M.** Diagnostic biologique d'une anémie macrocytaire. [www.med.univ-angers.fr/discipline/lab\\_hema/macro.html](http://www.med.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/macro.html). Mise à jour inconnue. Accédé en Août 2006.
58. **Zittoun J.** Anémies macrocytaires carencielles. 2002 Encycl.Med.Chir, Hématologie 1 : 1-11.
59. **Frémont S, Bieber S, Dauendorffer J, et al.** Evaluation du dosage immunoenzymatique par compétition de la vitamine B 12 par la technique Cedia Boehringer sur un Hitachi 911. 1998 Immunoanal Biol Spéc 13 : 43-48.
60. **Brocq F.** 2003 Aspect actuel de la maladie de Biermer et proposition d'un démarche diagnostic à partir de l'étude de 14 patients Médecine. Université Claude BERNARD LYON I, LYON.
61. **Mongin M, Harle JR, Weiller PJ.** Place de l'hypergastrinémie dans le diagnostic de la maladie de Biermer de l'adulte. 1992 Bull Acad Natl Med 176 : 693-700.



62. **Absalon Y, Dubel L, Johanet C.** Dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque : étude comparative RIA-ELISA. 1994 *Immunoanal Biol Spéc* 9 : 246-249.
63. **Ardeman S, Chanarin I.** Assay of Gastric Intrinsic Factor in the Diagnosis of Addisonian Pernicious Anaemia. 1965 *Br J Haematol* 11 : 305-314.
64. **Muckerheide M, Wolfman JA, Rohde DA, et al.** Studies on a radioassay for intrinsic factor antibody : comparison of methods and false positive results due to elevated serum B12 levels. 1984 *Am J Clin Pathol* 82 : 300-304.
65. **Waters HM, Smith C, Howarth JE, et al.** New enzyme immunoassay for detecting total, type I, and type II intrinsic factor antibodies. 1989 *J Clin Pathol* 42 : 307-312.
66. **Gomez Elizabeth A, Ehresmann Daniel D, Ledebuhr Lisa K, et al.** Development and validation of an Automated Chemiluminometric Immunoassay for Human Intrinsic Factor Antibodies in Serum. 2005 *Clinical Chemistry* 51 : 232-235.
67. **Barbier Y.** 1992 *Les immunodosages de la théorie à la pratique.*
68. **Beckman-Coulter.** UniCel DxI 800. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2005. Accédé en Août 2006.
69. **Beckman-Coulter.** Fiche technique REF 33820. Access Immunoassay Systems hTSH. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2003. Accédé en Août 2006.
70. **Beckman-Coulter.** Fiche technique REF 33880. Access Immunoassay Systems Free T4. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2003. Accédé en Août 2006.
71. **Beckman-Coulter.** Fiche technique REF 33850. Access Immunoassay Systems Free T3. [www.beckman.com](http://www.beckman.com) Mise à jour 2003. Accédé en Août 2006.
72. **Beckman-Coulter.** Fiche technique Immunotech IRMA TSH REF IM2123-IM1706. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2005. Accédé en Août 2006.
73. **Beckman-Coulter.** Fiche technique Immunotech FT4 RIA REF IM1363-IM3321. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2005. Accédé en Août 2006.
74. **Beckman-Coulter.** Fiche technique Immunotech RIA FT3 REF IM1579-IM3320. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2005. Accédé en Août 2006.
75. **Beckman-Coulter.** Fiche technique REF A 12985. Access Immunoassay Systems TPO antibody. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2003. Accédé en Août 2006.
76. **Beckman-Coulter.** Fiche technique REF 33980. Access Immunoassay Systems Thyroglobulin antibody. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2003. Accédé en Août 2006.
77. **BRAHMS.** Fiche technique REF 90.5. RIA anti-TPOn. [www.brahms.com](http://www.brahms.com). Mise à jour 2006. Accédé en Août 2006.



78. **BRAHMS.** Fiche technique REF 27.5. RIA anti-Tgn. [www.brahms.com](http://www.brahms.com). Mise à jour 2006. Accédé en Août 2006.
79. **Beckman-Coulter.** Fiche technique REF 387992. Access Immunoassay Systems Intrinsic Factor A. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2003. Accédé en Août 2006.
80. **Beckman-Coulter.** Fiche technique REF 33000. Access Immunoassay Systems Vitamin B12. [www.beckman.com](http://www.beckman.com). Mise à jour 2003. Accédé en Août 2006.
81. **DiaSorin.** Fiche technique REF IF01-96 Intrinsic Factor ELISA. [www.diasorin.com](http://www.diasorin.com). Mise à jour 2004. Accédé en Août 2006.
82. **AESKULISA.** Fiche technique REF 7512 AESKULISA Intrinsic factor. [www.aeskulisa.com](http://www.aeskulisa.com). Mise à jour 2005. Accédé en Août 2006.
83. **Bioadvance.** Fiche technique Anticorps antifacteur intrinsèque (IgG). REF EA 1362-9601G. [www.bioadvance.com](http://www.bioadvance.com). Mise à jour 2005. Accédé en Août 2006.
84. **Marcoullis G, Parmentier Y, Nicolas JP.** Blocking and binding type antibodies against all major vitamin B12-binders in a pernicious anaemia serum. 1979 Br J Haematol 43 : 15-26.
85. **Gaches F, Delaire L, Nadalon S, et al.** Fréquence des maladies auto-immunes chez 218 patients atteints de pathologies thyroïdiennes auto-immunes. 1998 Rev Med Interne 19 : 173-179.
86. **Perros P, Singh RK, Ludlam CA, et al.** Prevalence of pernicious anaemia in patients with Type 1 diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease. 2000 Diabet Med 17 : 749-751.
87. **Suzuki C, Hirai Y, Terui K, et al.** Slowly progressive type 1 diabetes mellitus associated with vitiligo vulgaris, chronic thyroiditis, and pernicious anemia. 2004 Intern Med 43 : 1183-1185.
88. **BRAHMS.** Fiche technique REF 101.5. RIA TRAK human. [www.brahms.com](http://www.brahms.com). Mise à jour 2006. Accédé en Août 2006.
89. **Centanni M, Marignani M, Gargano L, et al.** Atrophic body gastritis in patients with autoimmune thyroid disease: an underdiagnosed association. 1999 Arch Intern Med 159 : 1726-1730.
90. **Ness-Abramof R, Nabriski DA, Braverman LE, et al.** Prevalence and evaluation of B12 deficiency in patients with autoimmune thyroid disease. 2006 Am J Med Sci 332 : 119-122.
91. **Davidson RJ, Atrah HI, Sewell HF.** Longitudinal study of circulating gastric antibodies in pernicious anaemia. 1989 J Clin Pathol 42 : 1092-1095.





## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
  
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
  
- de jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



BON A IMPRIMER N° 345

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ





## RESUME

Dans le cadre de l'évaluation d'un automate, l'UniCel DxI 800®, nous avons étudié l'autoimmunité gastrique, par le dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque, chez des patients présentant des dysthyroïdies autoimmunes.

Au plan analytique, les résultats du bilan thyroïdien ont été comparés à ceux obtenus avec les techniques radioimmunologiques du laboratoire et les résultats du dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque à ceux obtenus avec trois techniques ELISA.

Pour l'ensemble du **bilan thyroïdien**, des discordances ont été observées entre les techniques pouvant affecter le diagnostic et le suivi thérapeutique des thyroépathies autoimmunes. Les discordances sont de **4,6%** pour la TSH, **78%** pour la T4I, **44%** pour la T3I, **4%** pour les **anticorps anti-thyropéroxydase** et **11%** pour les **anticorps anti-thyroglobuline**, elles ne semblent pas liées à un problème analytique mais à des normes inadaptées pour le DxI®.

L'interprétation du **dosage des anticorps anti-facteur intrinsèque** diffère chez un tiers des patients suivant la technique de dosage, remettant en cause la place privilégiée, depuis la disparition du test de Schilling, de cet examen dans le diagnostic de la maladie de Biermer. Le type d'anticorps détecté ainsi que la différence de sensibilité entre les techniques pouvant expliquer ces résultats.

Au plan épidémiologique, la prévalence des anticorps anti-facteur intrinsèque déterminée sur le DxI® est statistiquement plus importante chez les **patients dysthyroïdiens autoimmuns** (3,5%) que chez les patients dysthyroïdiens non autoimmuns justifiant chez ces derniers le dépistage de la maladie de Biermer à condition de définir au préalable une démarche diagnostique consensuelle jusqu'à présent absente.

**TITRE en anglais:** Evaluation of a multiparametric automate, application to the study of gastric dysimmunity in patients with autoimmune thyroid diseases.

## DISCIPLINE

Pharmacie-Biologie médicale

## MOTS CLES

RIA, IRMA, UniCel DxI 800®, autoimmunité thyroïdienne, maladie de Biermer, anticorps anti-facteur intrinsèque.

## ADRESSE

Service de Médecine Nucléaire

Hôpital Haut-Lévêque

Avenue du Haut-Lévêque

33600 Pessac