

## LES NOUVELLES RECOMMANDATIONS POUR LE DOSAGE DE LA THYROGLOBULINE : VOTRE MÉTHODE EST-ELLE CONFORME ?

M'Bark Sadouk<sup>1</sup>, Ph.D., CSPQ et Loubaba Belbaraka<sup>2</sup>, Ph.D.

<sup>1</sup> Département de biochimie  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)  
Hôpital Saint-Luc  
1058 rue Saint-Denis  
Montréal, QC, Canada, H2X 3J4  
m'bark.sadouk.chum@ssss.gouv.qc.ca

<sup>2</sup> Résidente en biochimie clinique,  
Programme post-doctoral (DEPD),  
Faculté de Médecine,  
Université de Montréal.

### INTRODUCTION

La thyroglobuline (Tg) est une glycoprotéine synthétisée par les thyrocytes (cellules épithéliales de la thyroïde). Elle est sécrétée dans la lumière des follicules thyroïdiens et sert de réservoir des hormones thyroïdiennes. La fixation d'iode sur les résidus tyrosine de la Tg et le couplage des iodyotyrosines aboutit à la synthèse des hormones T<sub>3</sub> (triiodothyronine) et T<sub>4</sub> (tétraiodothyronine ou thyroxine). Le mécanisme par lequel la Tg est libérée dans le sang n'est pas bien connu. Mais son taux sérique dépend de trois facteurs : la masse de tissu thyroïdien différencié, les lésions ou inflammations de la glande et enfin le degré de stimulation des récepteurs de TSH.

La Tg joue le rôle d'un véritable marqueur tumoral. Elle représente le principal outil du suivi post-opératoire des patients traités pour un cancer différencié de la thyroïde (DTC). Cependant son dosage et son interprétation posent tout un défi à la fois au laboratoire et au clinicien. Tout d'abord sur le plan technique, il existe de nombreuses limitations aux méthodes actuelles. On peut citer notamment le manque de standardisation entre les troupes commerciales, l'hétérogénéité des épitopes reconnus par les différents anticorps de détection utilisés, la sensibilité analytique parfois insuffisante, l'imprécision intéressante trop élevée ou encore l'interférence avec les auto-anticorps anti-Tg (TgAb). Sur le plan clinique, il faut tenir compte de plusieurs paramètres pour interpréter une valeur de Tg chez un patient suivi pour un DTC : la masse résiduelle du tissu thyroïdien après la chirurgie, les facteurs de risque (âge, variante de cancer, taille de la tumeur, envahissement, métastases...), le statut TSH et la présence ou non de TgAb. Les récentes directives de la *National Academy of Clinical Biochemistry* à l'intention des manufacturiers, des laboratoires et des cliniciens visent à améliorer les performances analytiques et cliniques du dosage de la Tg et par conséquent le suivi des patients (1). Nous présentons dans cet article, l'ensemble de ces recommandations (texte en gras et en italique) et nous discutons de l'impact de leur application.

### STANDARDISATION

La variabilité interlaboratoires a toujours été un problème pour le dosage de la Tg, le CV pouvant atteindre 65%. Une cause importante de cette variabilité était l'absence d'un standard commun. Un matériel de référence international (CRM 457), produit sous l'égide du Bureau de référence de la Commission européenne (2, 3), est disponible depuis 1994. Ce standard a contribué à réduire mais non à éliminer la variabilité interméthodes qui demeure toujours trop élevée (1, 4). Par conséquent, **toute méthode de dosage de la Tg doit être calibrée contre le standard CRM 457.**

La variabilité interméthodes est due également à la spécificité et à l'affinité de l'anticorps primaire vis-à-vis de la protéine mais elle peut aussi être due, du moins en partie, à la différence des matrices utilisées par les manufacturiers pour diluer les standards et les sérums de patients. Afin d'éviter le biais lié à l'effet matrice, **le diluant de la trousse doit être idéalement un sérum humain négatif pour la Tg et les TgAb. Les matrices non sériques doivent être choisies pour donner un signal (cpm, RLU, ...) identique à celui d'un sérum humain ne contenant pas de Tg ni de TgAb.** Le laboratoire se doit donc de vérifier auprès du manufacturier si sa méthode est calibrée ou non par rapport au CRM 457 et de comparer le signal généré par le diluant avec celui obtenu avec des sérums humains Tg- et TgAb-. Un dosage du matériel CRM 457 permet également de situer la méthode utilisée par rapport à la standardisation reconnue et d'introduire éventuellement un facteur de correction des résultats.

### CHANGEMENT DE MÉTHODE

Avant de changer de méthode de dosage de Tg, une corrélation avec la nouvelle méthode doit être réalisée en tenant compte de deux particularités : premièrement la corrélation doit être faite en utilisant des sérums de patients AbTg- **et** des sérums de patients AbTg+ et deuxièmement **si le biais entre les deux méthodes dépasse 10% chez les patients TgAb-, les cliniciens doivent en être avisés et on doit octroyer suffisamment de temps pour redéfinir le taux basal de la Tg des patients critiques** chez qui on n'a pas complètement exclu une récurrence du cancer. Une bonne communication et une collaboration entre le laboratoire et les médecins sont donc nécessaires pour appliquer cette recommandation.

### PRÉCISION

La précision est un paramètre très important pour valider la performance d'une méthode Tg et particulièrement la précision inter-essais puisque les patients avec un DTC sont suivis pour la vie aux 6 à 12 mois. Il faut donc pouvoir discriminer entre une variation réelle du taux sérique de la Tg et une variation causée par l'imprécision de la méthode. **La précision intéressante doit être établie en utilisant un pool de sérums TgAb- à trois niveaux de Tg :** niveau bas équivalent à 30–50% de la sensibilité fonctionnelle, niveau moyen (environ 10 µg/L) et niveau haut à 90% de la limite supérieure des valeurs de référence. L'imprécision maximale suggérée pour le suivi des patients avec un DTC est 5%, mais un tel CV est impossible à maintenir sur une période de 6 à 12 mois durant laquelle s'échelonnent deux dosages successifs pour un même patient. Une alternative **pour éliminer la variabilité inter-**

**essais est de doser les deux spécimens du même patient simultanément dans la même routine** ce qui implique pour le laboratoire de conserver adéquatement les sérums de patients pendant environ deux années. La précision intra-essai est en général moins problématique. Elle est plus pertinente quand on veut doser la réponse de la Tg à la stimulation par la TSH recombinante (rhTSH), les spécimens pré- et post-administration de la rhTSH étant dosés dans la même série.

## SENSIBILITÉ

Certaines méthodes sont incapables de détecter, chez les individus euthyroïdiens, des taux de Tg situés à la limite inférieure des valeurs de référence (environ 1 – 3 mg/L). **Ces méthodes ne doivent pas être utilisées pour le suivi des patients avec un DTC. Il est important de déterminer la sensibilité fonctionnelle de la méthode et de l'utiliser comme seuil de positivité au lieu de la limite de détection calculée à partir du standard zéro  $\pm$  2 écarts-types.** La sensibilité fonctionnelle est définie comme étant la plus petite concentration de Tg pour laquelle l'imprécision inter-essais ne dépasse pas 20%. Cette imprécision inter-essais doit être établie sur une période minimale de six mois. Par exemple, la trousse Bio-Rad que nous utilisons au CHUM possède une limite de détection de 0,2 mg/L alors que sa sensibilité fonctionnelle est de 1,0 mg/L. Ce seuil correspond également à la meilleure exactitude clinique (5). Certains auteurs utilisent même 1,5 mg/L comme valeur de Tg significativement différente de zéro pour cette trousse (6). Nous ne rapportons plus les valeurs de Tg comprises entre 0,2 et 1,0 mg/L. Toutefois, ces spécimens sont conservés pour un éventuel dosage, à la demande du médecin traitant, en tandem avec un nouveau spécimen du même patient dans la même routine.

## EFFET CROCHET

L'effet crochet dû à un excès d'antigène affecte surtout les méthodes immunométriques à une seule étape. Il peut se produire quand la concentration de Tg dépasse 1000 mg/L et conduire à des résultats faussement bas. **Toutes les trousse doivent être validées pour l'effet crochet avant leur mise en marché.** La vérification se fait par des mesures sur des **dilutions sériées au 1/10 de 20 sérums ayant des concentrations de Tg > 10 000 mg/L et 20 sérums ayant des concentrations de Tg > 100 000 mg/L.** Pour minimiser l'effet crochet, on recommande l'utilisation **d'une méthode à deux étapes.** Avec les méthodes à une étape, **on doit mesurer chaque spécimen à deux dilutions différentes soit nature et dilué 1 :10.** A notre avis, l'exigence du double dosage n'est pas pratique et il serait préférable d'encourager l'utilisation des méthodes à deux étapes. Il serait toutefois étonnant qu'un patient suivi par un endocrinologue puisse atteindre 1000 mg/L de Tg sur un intervalle de 6 à 12 mois.

## INTERFÉRENCE DES TgAb

L'interférence des TgAb est de loin le handicap majeur des méthodes de dosage de la Tg. Toutes les trousse sont sujettes à ce type d'interférence mais probablement à des degrés divers. **Les TgAb doivent être mesurés avec chaque dosage de la Tg.** Certaines méthodes offrent un test de récupération pour déceler la présence des TgAb. Brièvement, on ajoute une quantité connue de Tg dans un spécimen et on le dose par la suite comme un inconnu. Le ratio (Tg dosée/Tg ajoutée x 100) représente le % de récupération qui serait plus bas en présence de TgAb. **Les tests**

**de récupération ne doivent pas être utilisés pour évaluer les TgAb.** Il faut plutôt utiliser un **test TgAb immunologique quantitatif.** Cependant, la mesure de la concentration des TgAb dans le sérum ne peut pas prédire le degré d'interférence sur le dosage de la Tg. Si un résultat de Tg est rapporté en présence de TgAb, **un avertissement doit apparaître sur le rapport d'analyse qui indique le sens probable de l'interférence par les TgAb.** Les méthodes immunométriques sous-estimeront les niveaux de Tg en présence de TgAb alors que l'interférence peut aller dans un sens ou dans l'autre avec les méthodes RIA. **Le laboratoire ne doit pas rapporter un résultat de Tg non détectable si sa méthode donne des valeurs de Tg basses ou non détectables chez des patients TgAb+ avec DTC cliniquement documenté. Des mesures sériées des TgAb doivent être effectuées chez tous les patients TgAb+.** Il est essentiel que la mesure de TgAb soit faite par le même laboratoire qui fait le dosage de la Tg puisqu'il sera le mieux placé pour sélectionner la méthode de dosage des TgAb la plus appropriée. C'est sans doute en terme d'interférence des TgAb que le laboratoire peut aider le plus le clinicien en précisant le sens et si possible le degré de l'interférence. L'utilisation d'un ensemble de cinq anticorps monoclonaux dans la trousse Bio-Rad éliminerait, selon le manufacturier, cette interférence (7). Mais selon certains auteurs, même si le % de récupération de la Tg avec la trousse IRMA Bio-Rad est supérieur, le taux de faux négatifs est similaire à celui d'autres trousse IRMA (6). Notre propre expérience et des données préliminaires nous laissent croire que les TgAb n'interféreraient que peu avec le dosage de Bio-Rad. En effet pour 42 patients (TgAb+ et Tg non détectable) chez qui on a dosé l'ARN messager de la Tg (ARNm-Tg) seulement deux étaient positifs dont un à la limite du seuil de positivité.

## DOSAGE DE L'ARNm-Tg

Le dosage de l'ARN messager de la thyroglobuline (ARNm-Tg) a d'abord été suggéré comme une alternative au dosage de la Tg chez les patients TgAb+ et présenté comme étant plus sensible que le dosage de la Tg puisqu'il ne requiert pas l'arrêt du Synthroid et épargne ainsi aux patients les inconvénients de l'hypothyroïdie (8, 9). La valeur clinique de l'utilisation de ce test reste cependant encore à démontrer. Des questions liées à la sensibilité et à la spécificité tissulaire de l'ARNm-Tg dans le sang périphérique restent à clarifier (10). L'ARNm-Tg est décelable chez tous les sujets contrôles mais il ne corrèle pas avec le taux sérique de la protéine. Certaines études ont montré que le niveau de l'ARNm-Tg corrèle avec la présence ou l'absence de la maladie (9, 11). D'autres n'ont pas pu démontrer cette corrélation (12, 13). Ces résultats contradictoires refléteraient les différences de sensibilité et de spécificité des amorces de Tg, des systèmes de RT-PCR utilisés, des techniques d'imagerie, des immunoessais de Tg ainsi que le statut TSH des patients. Les résultats de notre validation clinique (14) se rapprochent le plus des données et conclusions de Fuggazola et al (15) selon lesquelles le test ARNm-Tg peut être combiné avec le dosage de la Tg pour augmenter la sensibilité diagnostique totale. Dans la cohorte CHUM, la sensibilité diagnostique est passée de 78% en dosant la Tg seule à 91% en combinaison avec ARNm-Tg. Avant que l'ARNm-Tg ne devienne un dosage de routine, la corrélation avec la récurrence doit être démontrée plus clairement, notamment chez les patients ARNm-Tg+ et chez qui la Tg est non détectable. De plus comme le dosage de l'ARNm-Tg est plus cher que celui de la Tg, **il doit être réservé pour l'instant aux patients à haut risque de récurrence ou aux patients positifs pour les TgAb chez qui le dosage de la Tg n'est pas concluant.** Ce sont les mêmes conclusions auxquelles nous sommes arrivés au CHUM suite à notre validation clinique du test ARNm-Tg.

## VALEURS DE RÉFÉRENCE

Chez les sujets euthyroïdiens normaux, la Tg sérique montre une distribution normale. Les valeurs ont tendance à être un plus élevées chez les femmes. Le tabagisme augmente ses niveaux. Comme la consommation d'iode influence les taux de Tg, il est important de **déterminer localement les valeurs de référence de la Tg indépendamment de celles suggérées par le manufacturier**. Les taux seraient augmentés dans les régions où l'apport en iode est insuffisant. **Les valeurs de référence doivent être établies à partir de 120 individus sains**. Les critères d'inclusion sont : **âge < 40 ans, non-fumeur, euthyroïdie (TSH 0,5 à 2,0 mU/L) sans histoire personnelle ou familiale de maladies thyroïdiennes et négatif pour les TgAb et les TPOAb**. Les valeurs de référence établies pour la population normale **ne doivent pas être indiquées sur les rapports d'analyse des patients avec un DTC ayant subi une thyroïdectomie**. Il faut les remplacer par des valeurs de référence plus appropriées à ces patients chez qui la Tg sérique dépendra du degré de la thyroïdectomie et des taux de TSH. Le tableau ci-dessous montre un exemple de valeurs de référence pour une méthode dont les valeurs sont 3–40 mg/L chez les sujets euthyroïdiens.

Conditions	Tg (mg/L)
Glande thyroïde normale (TSH 0,4 – 4,0 mU/L)	3 – 40
Glande thyroïde normale (TSH < 0,1 mU/L)	1,5 – 20
Lobectomie (TSH < 0,1 mU/L)	< 10
Thyroïdectomie totale (TSH < 0,1 mU/L)	< 2

## UTILISATION CLINIQUE DU DOSAGE DE LA Tg

L'augmentation de la Tg sérique n'est pas spécifique à une maladie. Elle peut être associée avec n'importe quelle atteinte de la glande thyroïde. Dans la majorité des cas, il s'agit d'atteintes bénignes. Outre le suivi du DTC, le dosage de **la Tg est indiqué pour confirmer la thyrotoxicose factice, pour déterminer l'étiologie de l'hypothyroïdie congénitale et pour évaluer l'activité des thyroïdites inflammatoires (thyroïdite subaiguë ou induite par l'amiodarone)**.

Chez les patients thyroïdectomisés, **la Tg post-opératoire chute de façon drastique avec une demi-vie de 3-4 jours sous thérapie suppressive avec LT4 ce qui reflète l'accomplissement de la thyroïdectomie**. Toute libération de la Tg par les marges de résection devrait être résorbée dans les deux mois suivant la chirurgie. Il n'existe pas de valeurs de référence de Tg pour ces patients **mais chez un patient complètement athyroïdien, la Tg doit être non détectable même si la TSH est élevée**.

On peut utiliser comme point de référence la relation entre la masse du tissu thyroïdien sain et les taux sanguins de la Tg : **un gramme de tissu thyroïdien sain libère 1 mg/L de Tg dans la circulation sous une TSH normale et 0,5 mg/L si la TSH est supprimée (< 0,1 mU/L)**. En moyenne, la masse du tissu résiduel après une thyroïdectomie totale est environ de 2 grammes, d'où le seuil de 2 mg/L suggéré pour les patients ayant subi une thyroïdectomie totale réussie et ayant une TSH inférieure à 0,1 mU/L.

Durant la thérapie avec LT4 (Synthroid) et la suppression de la TSH qui en découle, **si la Tg est détectable, les changements de la masse de la tumeur peuvent être suivis par des dosages sériés de la Tg. Il n'est pas nécessaire dans ce cas d'augmenter la TSH** en arrêtant la prise du Synthroid. Par contre, **si la Tg est non détectable** (toujours sous thérapie LT4 et en absence de TgAb), **la Tg stimulée par la TSH sera plus sensible que la Tg mesurée sous LT4 pour la détection de la maladie au niveau du cou**.

La réponse de la tumeur à la TSH peut être déterminée par le degré d'augmentation de la Tg dans le sérum. **Après stimulation par la TSH, la Tg augmente généralement d'un facteur supérieur à 5 par rapport au taux basal sous LT4, la rhTSH étant moins efficace que la TSH endogène suite à l'arrêt de LT4**. Il faut noter que pour les tumeurs très faiblement différenciées ou **chez les patients avec TgAb, l'augmentation de la Tg suite à la stimulation par la TSH est altérée ou absente** et ce même si la Tg basale était détectable. Du fait que les TgAb sont un facteur de pronostic négatif indépendant (16), **les mesures sériées des TgAb comme marqueur tumoral sont une alternative valable chez les patients TgAb+**. Un dernier élément, totalement nouveau, est la **recommandation du dosage de la Tg en préopératoire pour déterminer le pouvoir de sécrétion de la tumeur**. Ceci permettra de distinguer entre les tumeurs faiblement sécrétrices et celles fortement sécrétrices de Tg (environ les 2/3 des patients). Une légère augmentation de la Tg en post-opératoire n'aura pas la même signification clinique pour les deux types de tumeurs.

## CONCLUSION

L'application des recommandations touchant la standardisation CRM457, la détermination de la sensibilité fonctionnelle et l'archivage des spécimens amélioreront certainement la performance du dosage de la Tg sans perturber ni l'organisation ni le budget du laboratoire. L'effet crochet nous semble moins important que ce que les directives laissent croire. L'interférence causée par les TgAb continuera à être le principal défi pour les futures méthodes de dosage de la Tg. La standardisation du test ARNm-Tg et sa validation clinique sur une plus grande échelle pourraient contribuer à réduire la limitation imposée par les TgAb.

## RÉFÉRENCES

1. National Academy of Clinical Biochemistry. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13 : 57-67.
2. Feldt-Rasmussen U, Profilis C, Colinet E. Purification and certification of human thyroglobulin reference material CRM 457. Community Bureau of Reference of the European Commission, report EUR 15611 EN; 1994.
3. Feldt-Rasmussen U, Profilis C, Colinet E, Black E, Bornet H, Bourdoux P et al. Human thyroglobulin reference material (CRM 457) 2nd part: Physicochemical characterization and certification. *Ann Biol Clin* 1996; 54 : 343-8.

4. Sadouk M, Schneider W, Boucher A, de Montigny C, Boutin JM. Comparison of diagnostic performance of three thyroglobulin assays in the monitoring of differentiated thyroid carcinoma. 75th Annual Meeting of the ATA 2003 [abstract].
5. Marquet PY, Daver A, Sapin R, Bridgi B, Muratet JP, Hartmann DJ, et al. Highly sensitive immunoradiometric assay for serum thyroglobulin with minimal interference from autoantibodies. *Clin Chem* 1996; 42 : 258-62.
6. Mariotti S, Barbesino G, Caturegli P, Marino M, Manetti L, Pacini F et al. Assay of thyroglobulin in serum with thyroglobulin autoantibodies: an obtainable goal ? *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80 : 468-72.
7. Calzolari C, Marquet PY, Pau B. Thyroglobulin IRMA Pasteur immunoassay: sensitivity of the assay and interference from thyroglobulin autoantibodies. *Clin Chem* 1999; 43 : 413-5.
8. Ringel MD, Ladenson PW and Levine MR. Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83 : 4435-42.
9. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 : 4037-42.
10. Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurek R, Renneberg H et al. Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 2000; 82 : 1650-5.
11. Savagner F, Rodien P, Reynier P, Rohmer V, Bigorgne JC, Malthiery Y. Analysis of Tg transcripts by real-time RT-PCR in the blood of thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 : 635-9.
12. Span PN, Slegers MJ, van den Broek WJ, Ross HA, Nieuwlaat WA, Hermus AR, Sweep CG. Quantitative detection of peripheral thyroglobulin mRNA has a limited clinical value in the follow-up of thyroid cancer patients. *Ann Clin Biochem* 2003; 40 : 94-9.
13. Eszlinger M, Neumann S, Otto L, Paschke R. Thyroglobulin mRNA quantification in peripheral blood is not a reliable marker for the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer. *Eur J endocrinol* 2002; 147 : 575-82.
14. Sadouk M, Boucher A, Lavoie J, Chartrand R, Belanger R, Boutin JM. The clinical utility of thyroglobulin messenger RNA quantification in the monitoring of patients with differentiated thyroid carcinoma. 74th Annual Meeting of the ATA 2002 [abstract 116].
15. Fugazzola L, Mihalich A, Persani L, Cerutti N, Reina M, Bonomi M, et al. Highly sensitive serum thyroglobulin and circulating thyroglobulin mRNA evaluation in the management of patients with differentiated thyroid cancer in apparent remission. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 : 3201-8.

## Abréviations

ARNm-Tg	:	ARN messenger de la thyroglobuline
cpm	:	coups par minute
DTC	:	carcinome différencié de la thyroïde
LT4	:	lévothyroxine sodique (Synthroid®)
RIA	:	essai radioimmunologique
RLU	:	relative light units
rh-TSH	:	TSH recombinante humaine
Tg	:	thyroglobuline
TgAb	:	anticorps anti-thyroglobuline
TPOAb	:	anticorps anti-thyroperoxydase