



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES**



DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

PROJET DE FIN D'ETUDES
Licence en Sciences & Techniques :
Biologie & Santé

SÉROLOGIE DES HORMONES THYROÏDIENNES (TH)

Présenté par : MALIKI Sarra

Encadré par :

Dr. Mrini. R : Chef de laboratoire d'immuno-sérologie,
CHU Hassan II de Fès

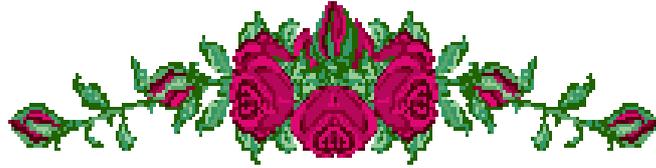
Pr. BEKHTI. K : Professeur à La FST de Fès

Soutenu le : Lundi 10 Juin 2013

Devant le jury composé de :

- Pr. BEKHTI. K : Président
- Dr. MRINI. R : Encadrant
- Pr. FADEL. F : Examineur

Année Universitaire : 2012-2013



DÉDICACES

À mes chers parents

Rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et bien être, afin que je puisse poursuivre mes études et réaliser mes objectifs. Mon plus vif espoir est de vous voir à mes cotés le plus long possible. Je vous dois tout, veuillez trouver dans ce modeste travail, le témoignage de mes profonds sentiments.

À tous les membres de ma famille :

Je vous exprime à travers ce modeste travail mes sentiments d'amour et d'affection.

À mes enseignants :

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde reconnaissance et ma grande estime.

Remerciements

Avant tous, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir aidé à porter ce travail à son terme.

Mes remerciements sont particulièrement destinés à mes chères encadrantes Dr. MRINI.R et Pr. BEKHTI.K pour l'aide, la collaboration, les précieux conseils et la compréhension qu'elles ont montrés à mon égard, ainsi que pour toutes les informations utiles qu'elles n'ont cessées de me fournir pendant toute la période consacrée à la réalisation de ce modeste travail.

Je tiens à faire parvenir mes sincères expressions de gratitude et de reconnaissance à l'ensemble du corps enseignant de mon département pour l'aide, la compréhension, ainsi que pour la précieuse formation qu'ils n'ont cessé de nous fournir pendant toute la période de ma formation au sein de ce département.

Enfin, j'espère que ce modeste travail soit à la hauteur.

Espérant que les futurs étudiants puissent mieux le développer en y trouvant un point de départ.

Je remercie plus particulièrement ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Introduction.....1

Etude bibliographique

I. Les hormones thyroïdiennes.....2

- 1- Présentation de la thyroïde.....2
- 2- Métabolisme des Hormones thyroïdiennes.....3
 - 2.1. Structure des HT.....3
 - 2.2. Biosynthèse des HT.....4
 - 2.3. Distribution et catabolisme des HT.....5
 - 2.4. Régulation de la fonction thyroïdienne.....7
 - 2.5. Mécanismes d'action.....7
- 3- Effets biologiques des HT.....8
- 4- Les anticorps antithyroïdiens.....9
- 5- Les marqueurs.....10
- 6- Physiopathologie et traitement.....11
 - 6.1 – Hyperthyroïdie.....11
 - 6.2 – Hypothyroïdie.....12

II. Epreuves diagnostiques des HT.....13

III. Techniques de dosage des HT.....14

- 1- Dosages avec un excès de réactif : méthodes immunométriques ou méthodes directes14
- 2- Dosages avec réactif limitant : méthodes par compétition ou méthodes indirectes15
- 3- Dosage RIA (RadioImmunoAssay)15
- 4- Dosages des hormones totales15

Matériels et méthodes

1. Lieu de stage.....	16
2. Prélèvement et transport au laboratoire.....	16
3. Test ELISA pour la détermination quantitative de la TSH.....	16
a. - Principe.....	16
b. - Matériels.....	17
c. - Réactifs et contenus.....	17
d. - Mode opératoire.....	18
e. - Validation du test.....	20
f. - Calcul.....	20
g. - Interprétation des résultats.....	20
h. - Valeurs attendues.....	21
4. Dosage de TSH par l'automate Architect system TSH.....	21
4.1- Définition.....	21
4.2 - Principe.....	22
4.3 – Calibration.....	22
4.4 - Les résultats.....	23
4.5 - Valeurs attendues.....	23
4.6 - Limites de la méthode.....	23
Résultats et Discussion.....	25
Conclusion.....	26
Références bibliographiques.....	27
Glossaire.....	29

Liste des figures et des tableaux

Listes des figures

Figure 1 : localisation de la glande thyroïde.....	2
Figure 2 : Structure de la thyroïde.....	2
Figure 3 : Structure des hormones thyroïdiennes.....	3
Figure 4 : Schéma de la synthèse des hormones thyroïdiennes	4
Figure 5 : origine et durée de vie des hormones thyroïdiennes	6
Figure 6 : schéma simplifié du mécanisme de feed-back négatif.....	7
Figure 7 : Schéma de la méthode directe.....	14
Figure 8 : Schéma de la méthode indirecte.....	15
Figure 9 : Appareil ARCHITECT System.....	21

Listes des tableaux

Tableau 1 : Schéma de pipetage.....	23
-------------------------------------	----



Introduction

Le diagnostic in-vitro regroupe toutes les techniques, les appareils ou les dispositifs utilisés au cours de tests médicaux pour analyser des échantillons issus du corps humain. Dans les années à venir, ce marché est amené à croître fortement. Tous les acteurs de la santé reconnaissent en effet que les tests jouent un rôle stratégique dans l'amélioration des coûts et de la qualité des soins, grâce à des diagnostics plus précoces et plus précis et un suivi constant du patient.

Dans les années 50, les dosages immunologiques auront un rôle très important en « thyroïdologie », comme dans tous les autres domaines de l'endocrinologie. L'un des enjeux du diagnostic à savoir une détection très sensible est en grande partie aujourd'hui atteinte. Les travaux de recherche se tournent maintenant vers la simplification des tests en utilisant des automates pour la détermination quantitative de la TSH.

Le présent travail fera l'objet de **décrire** la procédure de dosage des hormones thyroïdiennes (HT) plus particulièrement la TSH par deux techniques : **Test d'ELISA et par automate Architect system TSH.**

En effet, l'exploration biologique de la fonction thyroïdienne intervient en complément de l'examen clinique. Elle permet :

- de confirmer les situations d'hyper, ou d'hypothyroïdie.
- d'aider à l'enquête étiologique pour préciser l'origine auto-immune, iatrogène, génétique de l'affection.
- d'effectuer la surveillance de la dysfonction ou de la pathologie tumorale.

Des outils performants, qui contribuent à ces objectifs, sont actuellement à la disposition des médecins. Il est essentiel de bien les utiliser en connaissant leurs limites et leurs indications en se fondant sur les divers consensus multidisciplinaires de prises en charge des pathologies thyroïdiennes.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les hormones thyroïdiennes (HT)

La glande thyroïdienne permet aux tissus de fonctionner de façon optimale en sécrétant deux hormones importantes : la thyroxine (T4) et la tri-iodothyronine (T3). La quantité de T4 sécrétée par la thyroïde est d'environ 80 microgrammes/jour alors que celle de T3 produite n'est que de 25 microgrammes/jour environ (2), dont moins d'1/3 est directement sécrété par la thyroïde, le reste provenant de la désiodation de T4 au niveau des tissus périphériques. La demi-vie de T4 dans le sang circulant est voisine de 8 jours, alors que celle de T3 est d'environ 1 jour (6).

1- Présentation de la thyroïde

La glande thyroïdienne est un organe endocrine : sa fonction est de produire des hormones. Elle est située à la base du cou.

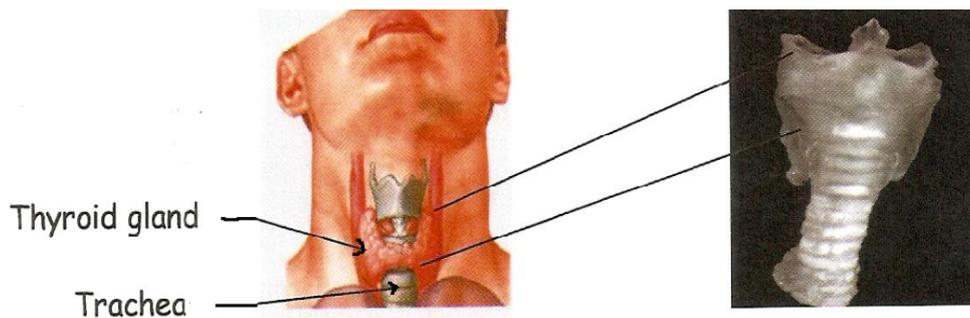


Figure 1 : localisation de la glande thyroïde

La glande thyroïde est organisée en follicules formés par épithélium de cellules folliculaires (thyrocytes) délimitant une cavité- l'espace folliculaire ou colloïde. Les thyrocytes, responsables de la synthèse des hormones thyroïdiennes représentant plus de 99% des cellules de la glande (6).

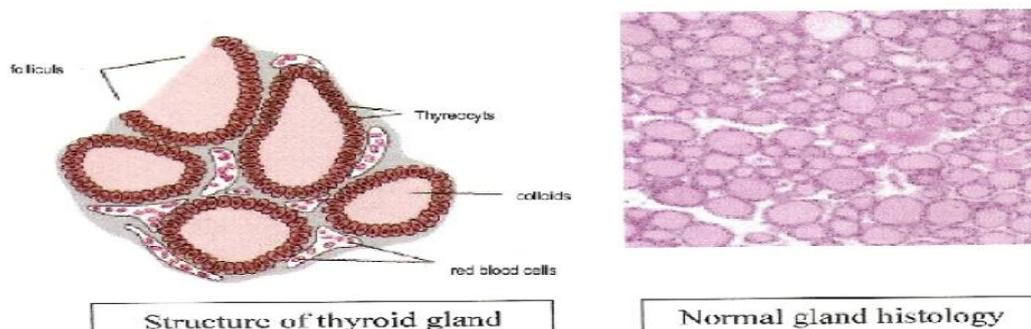


Figure 2 : Structure de la thyroïde

2- Métabolisme des Hormones thyroïdiennes

2.1. Structure des HT :

- Les hormones thyroïdiennes possèdent une même structure organique (2-5) : la thyronine, formée par deux noyaux aromatiques reliés par un pont éther. Les hormones se différencient entre elles par le nombre et la place variables des atomes d'iode qu'elles portent.

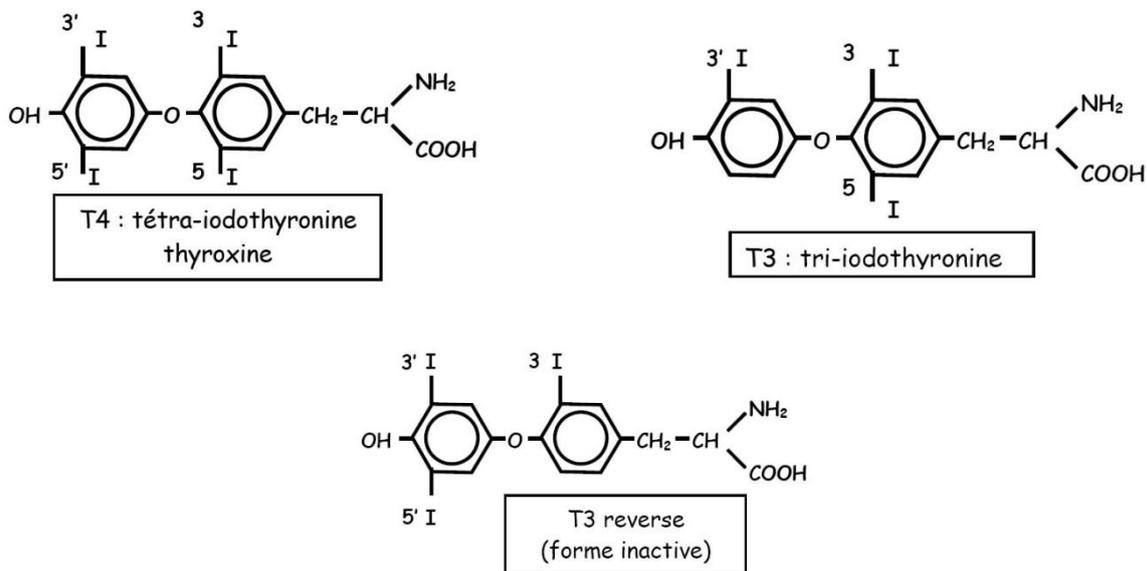


Figure 3 : Structure des hormones thyroïdiennes

- La thyroglobuline :
Il s'agit d'une glycoprotéine qui est une très grosse molécule dimérique (PM= 660.000) dont le monomère contient 2750 aminoacides ainsi que l'iode se fixe sur les résidus tyrosyls (2).
La synthèse de la thyroglobuline s'opère par assemblage successif d'acides aminés le long des ribosomes du réticulum endoplasmique dont la captation d'acides aminés par les cellules thyroïdiennes est très active. L'adjonction des résidus glucidiques s'opère au stade final de la synthèse dans l'appareil de GOLGI alors que l'iodation des tyrosines se situe après assemblage de la molécule de thyroglobuline.

2.2. Biosynthèse des HT

Elle comporte les étapes suivantes schématisées ci-dessous :

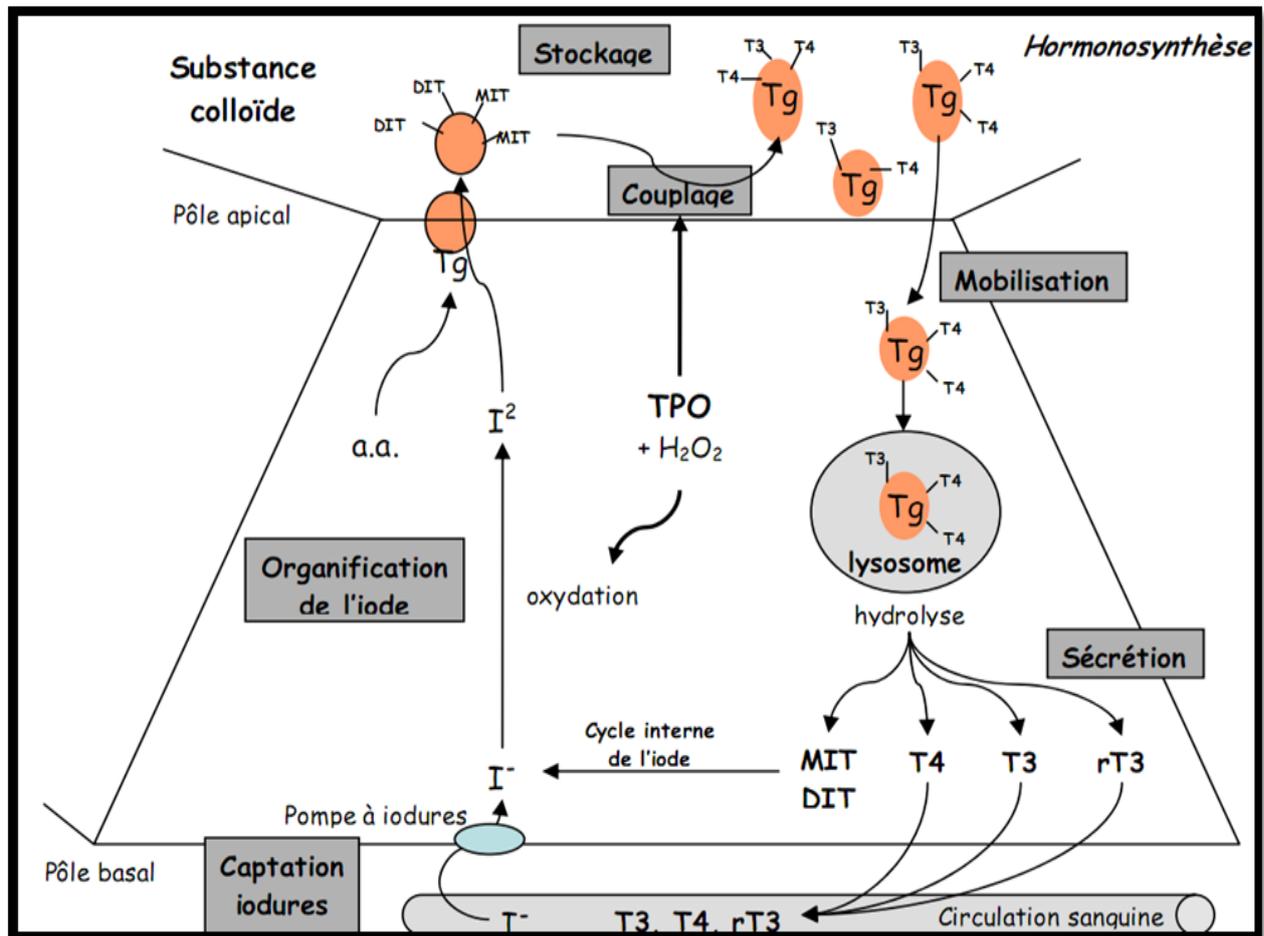


Figure 4 : Schéma de la synthèse des hormones thyroïdiennes (2).

L'iode est un oligo-élément relativement rare, dont les réserves sont faibles dans l'organisme (10 à 20 mg dans la thyroïde). Il est absorbé sous forme d'iodures I^- par l'intestin grêle puis l'iodure diffuse après absorption dans le plasma et les liquides extracellulaires où l'équilibre est atteint 4h après l'ingestion. Tant que l'épuration plasmatique de l'iodure s'effectue par la thyroïde et le rein.

- La première étape est donc celle de la capture d'iodures circulants à l'aide d'une pompe spécifique, selon un mécanisme actif, ATP-dépendant (avec co-transport sodique). La captation d'iodure est stimulée par la **TSH** et inhibée par le brome, des anions comme le thiocyanate, SCN^- le perchlorate, ClO_4^- et le pertechnectate.

- Organification de l'iode :

L'oxydation de l'iode nécessite la présence d'une enzyme spécifique liée à la membrane, la thyroperoxydase (TPO) en présence d' H_2O_2 . L'iode oxydé peut se lier aux résidus tyrosyls de la thyroglobuline donnant naissance aux précurseurs des hormones thyroïdiennes : MIT, DIT. L'iodation de la Tg se fait au pôle apical, dans la substance colloïde.

- Couplage et stockage :

Un résidu de MIT et un résidu de DIT se combinent pour former la **T3**, et deux résidus de DIT pour former la **T4** ou thyroxine, la thyroperoxydase intervient également dans le couplage des précurseurs. La thyroglobuline porteuse d'hormones thyroïdiennes est alors stockée dans la cavité colloïde (réserves thyroïdiennes en hormones pour environ deux mois, permettant de pallier aux variations des apports).

- Libération :

La thyroglobuline passe dans la cellule épithéliale par microendocytose, hydrolysée par des enzymes protéolytiques libérant ainsi les hormones thyroïdiennes T3 et T4 qui sont ensuite sécrétées dans le plasma. La MIT et la DIT, ainsi libérées par hydrolyse de la thyroglobuline sont en grande partie désiodées dans la cellule épithéliale et l'iodure est récupéré pour une nouvelle synthèse hormonale. Une partie de la T3 libérée par les thyrocytes provient de la transformation de T4 en T3 sous l'influence de la 5'-désiodase.

2.3. Distribution et catabolisme des HT

Les hormones thyroïdiennes sont hydrophobes et se lient donc à des protéines de transport :

- ❖ Non spécifique : albumine (pour une petite partie).
- ❖ Spécifique : TBG - *thyroxine binding globulin* (environ 75-80 %), TBPA - *thyroxine binding préalbumine* ou TTR- *transthyrétine* (15-20 %) (2).

Il est important de rappeler que seule la fraction libre, même très minoritaire (0,01 à 0,03% de la t4 et 0,1 à 0,4% de la T3) est active. La totalité de la T4 circulante provient de la production thyroïdienne, tandis que la plus grande partie de la T3 est issue de la conversion périphérique de T4 en T3 (figure 5).

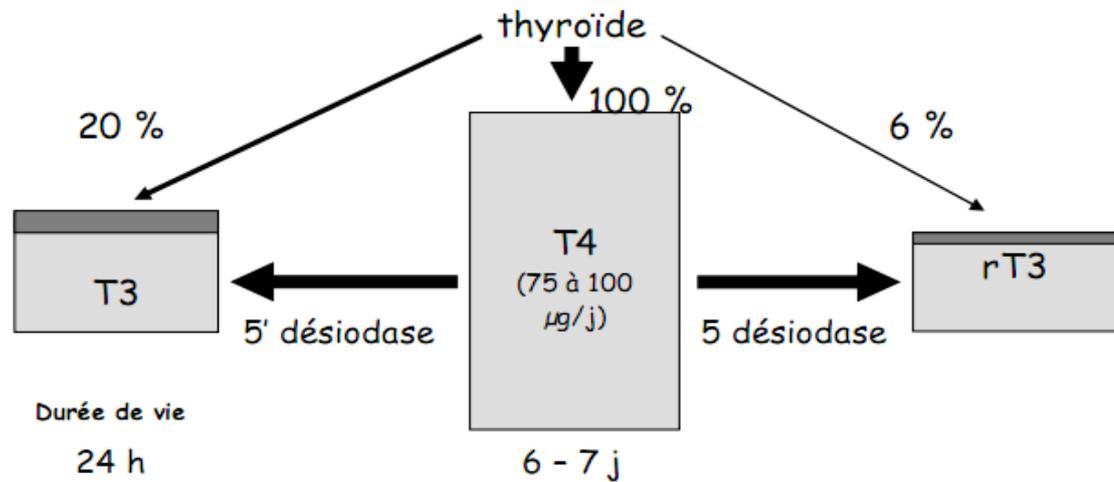


Figure 5 : origine et durée de vie des hormones thyroïdiennes (2).

La désiodation périphérique est le fait d'enzymes : la 5' désiodase qui permet la conversion de T4 en T3 et dont il existe deux types.

- La 5' désiodase de type 1, retrouvée dans le foie, le rein, la thyroïde et de nombreux autres tissus périphériques, est fortement modulée par l'état nutritionnel. La 5' désiodase de type 2 est présente dans le système nerveux central, l'hypophyse et la thyroïde. Son activité est majorée en cas d'hypothyroïdie de façon à couvrir les besoins du système nerveux central en hormones actives.
- la 5 désiodase transforme la T4 en T3 reverse, inactive.

La dégradation des HT se fait au niveau du foie et du rein par diverses voies : conjugaison (puis excrétion biliaire), désamination et décarboxylation de la chaîne latérale alanine, désiodation périphérique

2.4. Régulation de la fonction thyroïdienne

La thyroïde est une glande hypothalamo-hypophysaire dépendante dont la sécrétion est soumise physiologiquement au contrôle de TSH. Elle fonctionne selon un mécanisme de « feed-back » (rétrocontrôle) négatif (figure 6).

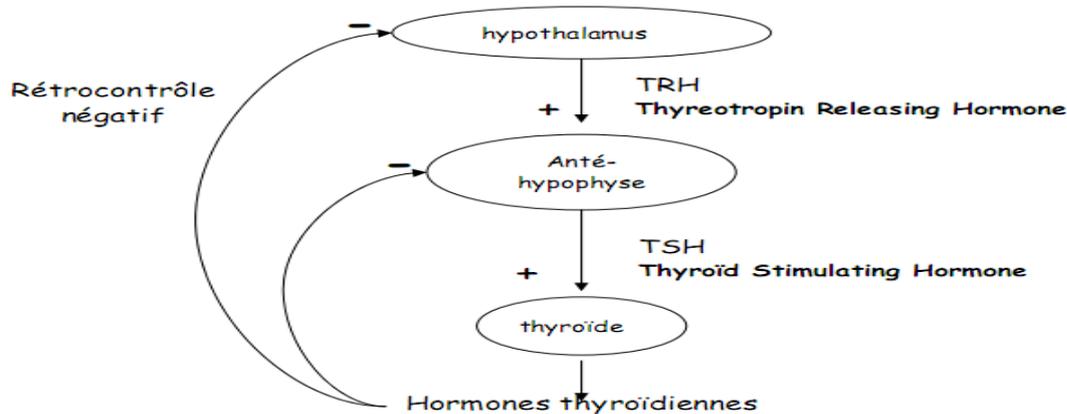


Figure 6 : schéma simplifié du mécanisme de feed-back négatif (20).

La quantité d' HT libres circulantes règle la quantité de TSH sécrétée : à l'état physiologique, quand les HT diminuent ; la TSH augmente et inversement. La TSH est par ailleurs soumise au contrôle de TRH hypothalamique. Le rétro-contrôle des HT sur la sécrétion de TRH est encore discuté.

T3 et T4 sont toutes deux impliquées dans le mécanisme du « feed-back » négatif. Ce dernier est mis à profit en clinique lors du test de freinage à la T3 (test de Werner).

2.5. Mécanismes d'action

Après passage transmembranaire, (et éventuellement conversion de T4 en T3), les hormones thyroïdiennes vont agir à différents niveaux :

- sites d'actions nucléaires : La T3 se lie à un récepteur cytosolique nucléotrope ; le complexe entre dans le noyau et participe à la régulation de l'expression génique ;
- sites d'actions extra nucléaires : La T3 exerce des actions membranaires avec un effet facilitateur du métabolisme cellulaire (potentialisation des récepteurs adrénergiques et des pompes ioniques, facilitation du passage de substrat énergétiques tels que le glucose et les acides aminés). Elle exerce également des effets au niveau de la mitochondrie avec augmentation de la calorigénèse et de la VO₂ (20).

3- Effets biologiques des HT

➤ Effets sur la croissance et le développement

Les HT sont indispensables à la croissance et au développement, en particulier pour le système nerveux central et pour l'os... Elles participent aux mécanismes de maturation et de mise en place des connexions neuronales. Une carence durant cette période s'accompagne d'un retard mental pouvant être sévère (crétinisme). Chez l'adulte, l'hypothyroïdie peut s'accompagner d'un ralentissement et de somnolence, l'hyperthyroïdie étant caractérisée par une excitabilité et une irritabilité.

Ainsi que les HT agissent en synergie avec l'hormone de croissance (GH). Cette dernière favorise la chondrogenèse et la croissance du cartilage, tandis que les hormones thyroïdiennes permettent la maturation et l'ossification du cartilage. L'hypothyroïdie durant l'enfance aboutit à un nanisme dysharmonieux. Chez l'adulte l'hyperthyroïdie s'accompagnant d'un risque d'ostéoporose.

➤ Effets métaboliques :

- ⇒ Métabolisme basal : Les hormones thyroïdiennes augmentent la thermogénèse obligatoire et la VO₂.
- ⇒ Métabolisme glucidique : Les hormones thyroïdiennes sont hyperglycémiantes (majoritairement l'absorption intestinale des glucides et favorisent la production hépatique de glucose)
- ⇒ Métabolisme lipidique : Les HT augmentent la synthèse de cholestérol mais également sa dégradation hépatique. En somme elles diminuent le taux du cholestérol.
- ⇒ Métabolisme protéique : Les hormones thyroïdiennes augmentent la synthèse protéique mais ont également un effet catabolisant, qui devient prépondérant à doses supra physiologiques.
- ⇒ Métabolisme hydro minéral : Les hormones thyroïdiennes augmentent la filtration glomérulaire et le débit sanguin rénal. L'hypothyroïdie s'accompagne ainsi d'œdème.

➤ Effets tissulaires

- ⇒ Au niveau cardiaque, les HT exercent un effet chronotrope positif et inotrope positif.
- ⇒ Au niveau musculaire, les HT contrôlent la contraction et le métabolisme de la créatine. La carence en HT s'accompagne d'une augmentation de volume des muscles squelettiques. En effet, l'hyperthyroïdie s'accompagne d'une hyperexcitabilité musculaire et d'une amyotrophie dans les formes sévères.
- ⇒ Sur le tube digestif, les hormones thyroïdiennes favorisent le transit.

4- Les anticorps antithyroïdiens

✓ Les anticorps antithyroperoxydase (Ac antiTPO) :

Ce sont des IgG dont les taux sont corrélés à l'abondance de l'infiltrat lymphocytaire thyroïdien. Les dosages sont actuellement très sensibles et spécifiques. La concordance entre les trousse est bonne (>90%) bien que des problèmes de standardisation persistent (1).

✓ Les anticorps antithyroglobuline (Ac antiTg) :

L'immunisation se fait conjointement contre la TPO et la Tg. les Ac antiTPO apparaissent plus vite et/ou sont mieux détectés que les Ac antiTg. Donc, dans l'évaluation de l'auto-immunité thyroïdienne, la recherche des Ac antiTg ne doit pas être systématique en première intention. Elle ne sera réalisée qu'en cas de forte suspicion clinique et/ou échographique et devant une recherche d'Ac antiTPO négative. Seuls 3% de la population présentent des Ac antiTg sans antiTPO détectables (étude américaine NHANES III).

✓ Les anticorps anti-récepteur de la TSH (Ac antiRTSH) :

Ils se lient aux récepteurs de la TSH. La majorité de ces anticorps se comportent comme des Ac stimulants et constituent un marqueur diagnostique et pronostique de la maladie de Basedow. Dans de rares situations, ils ont une activité bloquante

responsable d'hypothyroïdie avec hypotrophie de la glande. Ils étaient jusqu'ici détectés par des techniques d'inhibition de liaison de la TSH marquée à des récepteurs humains ou porcins. De nouvelles méthodes automatisées ou non, avec utilisation d'Ac monoclonal hautement spécifique sont apparues. L'évaluation clinique de ces réactifs est bonne mais la stabilité parfois insuffisante.

5- Les marqueurs

La thyroglobuline (Tg)

Les cancers différenciés de la glande thyroïde (CDT) sont les cancers endocriniens les plus fréquents. Leur incidence s'est accrue ces dernières années sous l'effet d'un dépistage plus actif et d'une modification des pratiques.

La surveillance biologique des CDT opérés se réalise par les dosages de TSH, d'Ac antiTg et de Tg. Le taux de Tg doit être indétectable (1).

Le dosage de Tg dans les liquides de rinçage des aiguilles de ponction des nodules ou ganglions se généralise. Il révèle d'excellentes performances pour détecter des métastases ganglionnaires en complément de la cytologie.

La calcitonine :

La CT constitue un marqueur biologique du cancer médullaire de la thyroïde (CMT). La prévalence du CMT est faible (proche de 0.4%) (1). Depuis une dizaine d'années, en Europe, ce dosage s'est généralisé en pathologie nodulaire thyroïdienne optimisant la détection précoce des CMT, le geste chirurgical et la survie. Les principaux facteurs pouvant influencer un taux de CT sérique sont l'insuffisance rénale chronique, l'hypergastrinémie, l'existence d'une autre tumeur endocrine et le tabagisme.

6- Physiopathologie et traitement

Les dysfonctionnements de la glande thyroïde ont des répercussions multiples sur la santé, principalement au niveau du cœur, du poids, du système digestif, de la température corporelle, de la peau et sur le caractère. Les maladies de la thyroïde sont nombreuses et peuvent conduire à un manque (hypothyroïdie) ou au contraire à un excès d' HT (hyperthyroïdie). Dans certains cas, la thyroïde peut augmenter de volume et former un goitre. Elle peut être également le siège du développement de nodules qui correspondent le plus souvent à un kyste ou adénome bénin et plus rarement à un cancer de la thyroïde. Un nodule ou un goitre peut se former en dehors de toute anomalie du taux des hormones thyroïdiennes.

6.1- Hyperthyroïdie

L'hyperthyroïdie se définit comme une exagération du fonctionnement de la glande thyroïde qui a pour conséquence une production accrue, supérieure à la normale d'HT (T3 et/ou T4) ce qui entraîne une hyperhormonémie. Les symptômes sont surtout nerveux (anxiété, agitation, irritabilité, tremblement des mains) et cardiaques (palpitations, tachycardie, extrasystole) (7).

Elle est due soit à une :

- ❖ Une augmentation de la synthèse des HT telle que dans la maladie de Basedow, dans le nodule toxique ou le goitre multinodulaire toxique...
- ❖ Destruction des vésicules thyroïdiennes avec libération des HT.
- ❖ Administration exogène d'HT

Mais, toutes causes confondues, il n'existe que quatre types de "traitement" : trois véritables thérapeutiques (7), et une forme de traitement qui consiste à surveiller simplement l'évolution de la maladie, sans médicament. Les trois thérapeutiques sont celles-ci :

- ❖ Les traitements "ralentisseurs" de la fabrication des hormones thyroïdiennes. Ce sont les anti-thyroïdiens de synthèses : Néomercazole, Basdène et P.T.U (propylthiouracile).
- ❖ La chirurgie.
- ❖ Le traitement par iode radio-actif.

6.2- Hypothyroïdie

C'est un syndrome caractérisé par une carence en HT et ses effets périphériques. L'hypothyroïdie est moins fréquente ; à l'inverse de l'hyperthyroïdie, elle s'installe de façon lente et progressive. Plus courant chez les femmes de plus de 50 ans (20). Ensemble des manifestations liées à l'insuffisance, l'imperfection ou la non utilisation de la sécrétion thyroïdienne. Elle peut être due aux traitements :

- Après une ablation chirurgicale de la thyroïde (pour des nodules ou pour une hyperthyroïdie), un traitement à l'iode radio-actif ou des médicaments qui freinent la thyroïde (traitement de l'hyperthyroïdie) on donne un traitement par hormones thyroïdiennes dès que la TSH monte (ou même avant en cas de chirurgie), pour éviter la survenue d'une hypothyroïdie.
- Lors d'un traitement par la Cordarone (médicament donné par les cardiologues) il faut doser régulièrement la TSH pour dépister une hypothyroïdie.

Ainsi que la cause la plus fréquente de l'hypothyroïdie est la maladie de Hashimoto. C'est une maladie bénigne et facile à soigner. Votre médecin vous a peut-être fait doser les anticorps anti-TPO, qui sont trop élevés : c'est la signature de cette maladie de Hashimoto. Génétiquement influencé, votre organisme fabrique anormalement ces anticorps qui ralentissent le fonctionnement de votre thyroïde. Il s'agit d'auto-anticorps, c'est à dire d'anticorps dirigés contre vous, en l'occurrence contre votre thyroïde, d'où le nom de maladie auto-immune (9).

II- Epreuves diagnostiques des HT

- Mesure de la TSH : Particulièrement utile dans le diagnostic de l'hypothyroïdie, le dosage de la TSH doit être effectué en premier intention. Une TSH élevée provoque une hypothyroïdie primaire (13).
- Pourcentage de la T4 libre : la découverte d'une élévation de la TSH doit être contrôlée et associée à un dosage d'hormone thyroïdienne libre (T4L). Si la TSH est élevée, la baisse de la T4L confirme l'hypothyroïdie et permet d'en apprécier la profondeur. Si la T4L est normale, il s'agit lors d'une hypothyroïdie infraclinique. Il n'y a pas lieu d'effectuer le dosage de T3L (11).
- Dosage de la T3 totale : utile dans l'hyperthyroïdie légère car la hausse de la T3 est plus précoce et plus marquée que celle de la T4.
- Utilisation de la TRH : en injection intraveineuse pour effectuer un test pharmacologique de stimulation de la sécrétion de TSH et évaluer la réserve hypophysaire en TSH.
- Dosage des anticorps antithyroïdiens : aide au diagnostic de la maladie auto-immune thyroïdienne.
- Captation thyroïdienne à l'iode radio-actif : précise l'étiologie d'une hyperthyroïdie et permet de calculer une dose thérapeutique d'I*.
- Scintigraphie : est la première méthode d'imagerie thyroïdienne.
Elle est un examen utile grâce à son double aspect morphologique et fonctionnel, mais a été supplanté par l'échographie et la cytoponction dans l'exploration des nodules thyroïdiens (9).
- Ecographie thyroïdienne :
Elle aide au diagnostic étiologique de l'hypothyroïdie (9). Par rapport à la scintigraphie, l'échographie a l'avantage d'être un examen non irradiant et plus répandu donc plus facile à obtenir. Elle donne une analyse morphologique de la thyroïde alors que la scintigraphie donne une image fonctionnelle. Elle permet de visualiser également les structures extra-thyroïdiennes.
- Biopsie-aspiration ...

III- Techniques de dosage des HT

Les tests biochimiques utilisés actuellement pour explorer la fonction thyroïdienne sont très basés sur une réaction antigène-anticorps utilisant des anticorps monoclonaux hautement spécifiques et de haute affinité. Parmi les techniques utilisées pour établir le bilan immunologique :

1- Dosages avec un excès de réactif : méthodes immunométriques ou méthodes directes :

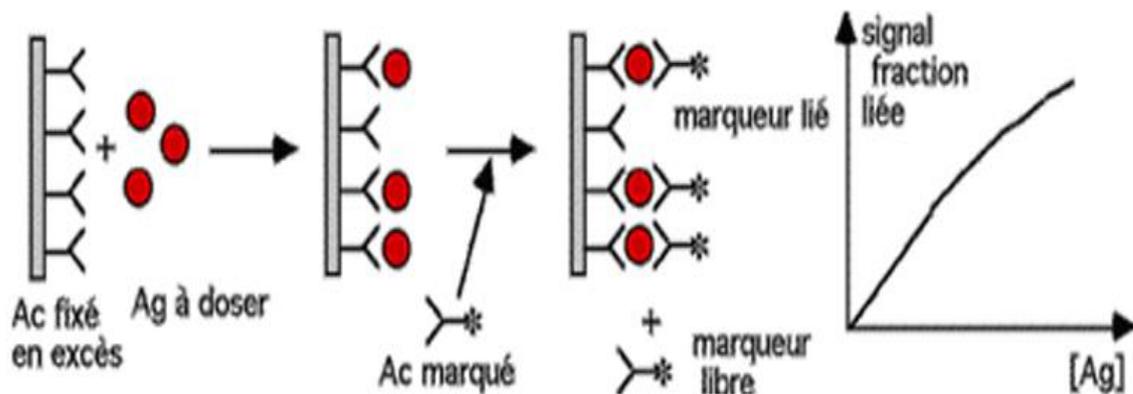


Figure 7 : Schéma de la méthode directe

La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps fixé. Il est ensuite révélé par un anticorps marqué.

On mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène à doser.

2- Dosages avec réactif limitant : méthodes par compétition ou méthodes indirectes

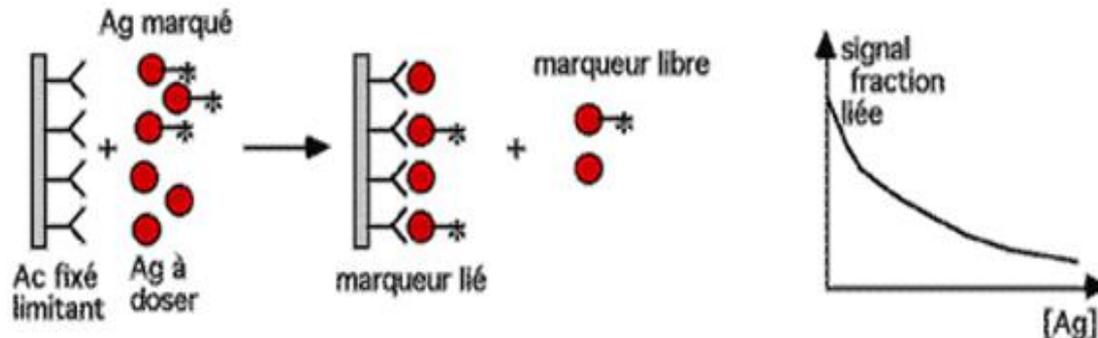


Figure 8 : Schéma de la méthode indirecte

L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps ; la totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction liée qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser (Figure 8).

3- Dosage RIA (RadioImmunoAssay)

Actuellement, le marqueur radioactif le plus utilisé en immuno-analyse est l'iode 125. Les dosages RIA sont effectués par des méthodes manuelles ou semi-automatiques, rarement entièrement automatisées (12).

4- Dosages des hormones totales

La T4T et la T3T sont en général dosées dans le sérum à l'aide d'immunodosages compétitifs utilisant des marqueurs isotopiques, enzymatiques ou luminescents et des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Le dosage des hormones totales reste précieux pour suivre l'efficacité du traitement d'une hyperthyroïdie très sévère.

MATERIELS ET MÉTHODE

1. Lieu du stage

Mon stage a été réalisé dans le laboratoire central d'analyses médicales au sein du centre hospitalier et universitaire Hassan II de Fès (CHU), et plus précisément dans l'unité d'immuno-sérologie.

2. Prélèvement et transport au laboratoire

Le prélèvement est réalisé sur tube sec, le matin chaque échantillon doit avoir une fiche d'identification dont elle est inscrite la date, le numéro, le service, le sexe, l'âge, le nom et prénom du patient et les différentes analyses à effectuer.

Les échantillons doivent être apportés immédiatement au laboratoire. Toutes conditions de transport défavorables peuvent influencer les résultats.

3. Test ELISA pour la détermination quantitative de la TSH

3.1 - Principe

Le test ELISA TSH est basé sur la technique ELISA en sandwich classique. Comme un dosage de deuxième génération, il fait usage d'un enduit d'anticorps anti-TSH monoclonal hautement spécifique sur la surface du puits de microtitration. Dans la première étape d'incubation, des échantillons, des calibrateurs ou les contrôles et le conjugué d'enzyme (peroxydase-anticorps anti-TSH) sont mélangés pour former le complexe de type sandwich, qui est lié à la surface de l'incubation de l'enzyme conjugué en excès est éliminé par lavage.

Réactif de substrat est ajouté et la couleur qui en résulte, qui devient jaune après arrêt de la réaction avec la solution d'arrêt, est mesurée par photométrie.

L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration de la TSH dans un échantillon. L'absorbance des étalons et les échantillons sont déterminés en utilisant des systèmes ELISA. La concentration est évaluée au moyen d'une courbe d'étalonnage qui est établie à partir des étalons fournis avec le kit (1).

3.2 - Matériels :

- ⇒ Plaque à micropuits
- ⇒ Pipettes
- ⇒ Lecteur ELISA avec filtre 450 nm, avec un filtre de référence de 630-690 nm, si disponible.
- ⇒ Bandes adhésives
- ⇒ Eau distillée
- ⇒ Tubes à essai
- ⇒ Papier absorbant

3.3 - Réactifs et contenus

- MIC:** barrettes de la microplaque
8 puits bandes cassables, recouvertes d'anti-TSH (monoclonal, souris)
- CAL (A-F):** calibrateurs-- bouchons et les étiquettes colorées
(A: blanc, B: jaune, C :vert, D : rouge, E: bleu, F: noir)
6 * 2 ml Prêt à l'emploi, (l'homme)
TSH: 0 (A), 0,5 (B), 3,0 (C), 6,0 (D), 15,0 (E), et 30.0 (F) mUI / l
- CON (13ml)** conjugué enzymatique (bouchon blanc)
prêt à l'emploi, coloré en rouge pH 6.25
Anti-TSH marqué
- WS (50 ml)** solution de lavage WS (bouchon blanc)

SUB (15ml)	réactif substrat (bouchon noir)	pH 3,6
	Prêt à l'emploi, incolore à bleuâtre	
	3,3', 5,5' - tétraméthylbenzidine (TMB)	1,2 mmol / l
	Le peroxyde d'hydrogène	
STOP (15 ml)	solution d'arrêt (bouchon rouge)	
	L'acide sulfurique	

3.4 - Mode opératoire

Pour réussir le test ELISA pour la détermination quantitative de la TSH dans le sérum humain, il faut suivre le schéma de pipetage (tableau 1).

D'abord, il faut disposer le nombre de puits de microtitration désiré dans le support, déposer 50 µl de chaque calibrateurs, contrôles et les échantillons dans les puits appropriés. Après il faut déposer 100 µl de **CON** dans chaque puits.

- ⇒ bien mélanger et couvrir les barrettes de la microplaque avec une bande adhésive.
- ⇒ Incuber pendant 60 min à température ambiante 20-25°C
- ⇒ Décanter le contenu des puits et rincer les puits 5 fois avec de la solution de lavage diluée. Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
- ⇒ Ajouter 100 µl de solution Substrat à chaque puits. Et incuber pendant 15 min à température ambiante.
- ⇒ Stopper la réaction enzymatique en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits.

Enfin on lit la densité optique à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque dans les 5 min après avoir ajouter la solution d'arrêt.

Tableau 1 : Schéma de pipetage

Réactifs et les échantillons doivent être à température ambiante avant utilisation		
Etape 1	Puits (µl)	
	Calibrateurs	échantillon
CAL A-F (en double)	50	--
Echantillons, contrôles (en double)	--	50
CON	100	100
Mélanger et couvrir MIC avec bande adhésive		
Incuber pendant 60 min à 20-25 °C		
laver 5 fois comme décrit (voir W1-W3)		
WASH	300	300
Etape 2		
SUB	100	100
Incuber 15min à 20-25 °C (voir P8 dans l'annexe))		
STOP	100	100
mélanger soigneusement		
mesurer l'absorbance à 450 nm dès que possible ou dans les 30 minutes. après la fin de la réaction, en utilisant une longueur d'onde de référence 630-690 nm (si disponible)		

La procédure de lavage est critique. Un lavage insuffisant entraînera une mauvaise précision ou faussement élevée absorbance (12).

W1: enlever les bandes adhésives, Aspirer le contenu, ajouter la solution de lavage, aspirer au bout de 30 sec. Le temps de trempage et de répéter à laver 4 fois.

W2: en cas de lavages automatiques de remplissage et le premier avec une solution de lavage. Laver ensuite les bandes 5 fois. S'assurer que la cuve se remplit tous les puits complètement et aspire hors efficace au bout de 30 sec.

W3: Après le lavage, enlever le liquide restant en tapotant la plaque à l'envers sur du papier absorbant.

3.5 - Validation du test

Les résultats du test sont valides à condition que les critères suivants soient respectés:

- ✓ Absorbance maximale (**CAL F**) D.O ≥ 1.2
- ✓ Concentration de TSH à 80% du max. absorbance = $24,2 \pm 4,6$ mUI / l
- ✓ TSH à 50% du maximum. absorbance = $13,8 \pm 3,3$ mUI / l
- ✓ Concentration de TSH à 20% du max. absorbance = $5,5 \pm 3,0$ mUI / l

3.6 - Calcul

Une courbe dose-réponse est utilisé pour interpoler la concentration de TSH en mUI / l sur du papier millimétré. Tracer la courbe d'ajustement à travers les points tracés.

Pour déterminer la concentration de la TSH pour un échantillon inconnu (S), de localiser l'absorbance moyenne des doubles sur l'axe vertical de la concentration (en mUI / l) à partir de l'axe horizontal du graphique.

3.7 - Interprétation des résultats

Concentration sérique de TSH dépend de multiples facteurs: la fonction de la glande hypothalamus, la fonction de la glande thyroïde, et la réactivité de l'hypophyse à la TRH. Ainsi, la concentration de TSH seule n'est pas suffisante pour évaluer l'état clinique. Les variations génétiques ou la dégradation de TSH intact en sous-unités peuvent affecter les caractéristiques de liaison des anticorps et d'influencer le résultat final (13).

Les résultats ne peuvent ps être l'unique raison de conséquences thérapeutiques. Ils doivent être corrélés à d'autres observations cliniques et tests diagnostics.

3.8- Valeurs attendues

Résultats d'une étude avec une population euthyroïdien :

Plage normale: 0,3 à 6,2 mUI / l TSH (13).

Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs attendues en utilisant l'instrumentation, les méthodes de collecte de sang et de techniques de tests couramment utilisés dans ce laboratoire.

4-Dosage de TSH par l'automate Architect system TSH

4.1 - Définition

Architect TSH est un dosage immunologique microparticule par chimilumescence (CMIA) pour la détermination quantitative de l'hormone thyro-stimulante (TSH) humaine dans le sérum et le plasma humains.



Figure 9 : Appareil ARCHITECT System

4.2 - Principe

Architect TSH est un dosage immunologique en deux étapes pour la détermination de la concentration de l'hormone thyro-stimulante (TSH) dans le sérum ou le plasma humain, utilisant la technologie de dosage immunologique microparticule par chimiluminescence (CMIA) avec des protocoles de dosage flexibles appelée chemiflex.

Dans un premier temps, l'échantillon, les microparticules recouvertes d'anticorps anti-B TSH et le diluant de dosage TSH sont mis en présence. La TSH présente dans l'échantillon se lie aux microparticules recouverte d'anticorps anti-TSH. Après lavage, le conjugué d'anticorps anti- TSH marqué à l'acridinum est ajouté au cours de la seconde étape. Les solutions de préactivation et d'activation sont ensuite ajoutées au mélange réactionnel. La réaction chimiluminescente qui en résulte est mesurée en unités relatives de lumière (URL). Il existe une relation directe entre la quantité de TSH présente dans l'échantillon et les URL détectées par le système optique ARCHITECT i.

4.3 - Calibration

- Pour effectuer une calibration ARCHITECT TSH, analyser les calibrateurs 1 et 2 en double. Un échantillon de chacun des contrôles TSH doit être testé pour évaluer la calibration du dosage.

S'assurer que les valeurs des contrôles du dosage se situent dans les limites de concentration spécifiés dans le paquet insérer.

Les calibrateurs doivent être chargés en priorité.

- Limites de calibrateurs : 0,0000 à 100,0000 mUI / ml.
- Une fois la calibration de la TSH architecte est acceptée et mémorisée, tous les échantillons subséquents peuvent être testés sans étalonnage, à moins que:
 - un kit de réactifs portant un nouveau numéro de lot est utilisé.
 - Les valeurs des contrôles se situent en dehors de limites spécifiées.

4.4 - Les résultats

Le dosage Architect TSH utilise une méthode de traitement des données par l'ajustement de la courbe logistique à 4 paramètres (PLC, pondération en Y) pour créer une courbe de calibration

Autres unités de résultat : L'unité de résultat par défaut du dosage ARCHITECT TSH est la $\mu\text{UI/l}$. en cas de sélection de l'unité alternative mUI/l , le facteur de conversion utilisé par le système est 1. Formule de conversion : (concentration en $\mu\text{UI/ml}$) \times (1) = mUI/l .

4.5 - valeurs attendues

La plage de la normalité comprise entre $0,35 \mu\text{UI/ml}$ et $4,94 \mu\text{UI/ml}$ a été obtenue en analysant des échantillons de sérum provenant de 549 individus trouvés normaux par les dosages AxSYM hTSH ultrasensible II et AxSYM T4 libre (14).

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence, lesquels peuvent être spécifiques de la population en question, en raison de facteurs géographiques, alimentaires, environnementaux ou individuels.

4.6 - Limites de la méthode

Les échantillons analysés à l'aide du dosage ARCHITECT TSH doivent être traités selon les instructions du fabricant des tubes échantillons utilisés. Un traitement insuffisant (non respect des recommandations concernant le temps de coagulation, le temps et la vitesse de centrifugation et les techniques de préparation des échantillons) peut provoquer des résultats imprécis.

Pour établir un diagnostic, les résultats doivent toujours être utilisés conjointement avec d'autres données, à savoir les symptômes, les résultats d'autres analyses de la fonction thyroïdienne, les données cliniques, etc....

Si les concentrations de TSH ne correspondent pas à l'observation clinique, il est recommandé d'effectuer d'autres examens afin de pouvoir confirmer le résultat.

Une hyperthyroïdie suspectée, dont le diagnostic se fonde sur des taux de TSH faibles ou non décelable, doit être confirmée par d'autres examens de la fonction thyroïdienne ainsi que par d'autres informations d'ordre clinique.

Les échantillons provenant de patients auxquels ont été administrés des préparations d'anticorps monoclonaux de souris à des fins diagnostiques ou thérapeutiques peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent donner des résultats faussement élevés ou abaissés lorsqu'ils sont testés avec des kits de dosage utilisant des anticorps monoclonaux de souris.

Les anticorps hétérophiles présents dans le sérum humain peuvent réagir avec des immunoglobulines des réactifs, interférant ainsi avec les dosages immunologiques in vitro. Les patients régulièrement en contact avec des animaux ou des produits contenant du sérum d'origine animale peuvent être sujets à cette interférence et fournir de ce fait des valeurs anormales.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le laboratoire d'accueil pour le dosage des TSH utilise la méthode automates d'immuno-analyse (ARCHITECT i TSH) uniquement car elles peuvent détecter des valeurs basses typiques de l'hyperthyroïdie. Ces méthodes immunométriques non isotopiques atteignent pour la plupart une sensibilité fonctionnelle **de 0,01 mUI/l ou moins** (18), ce qui est la limite de détection nécessaire pour couvrir toute la zone de mesure de TSH rencontré de l'hypo- à l'hyperthyroïdie, et ceci répond aux exigences d'un test TSH de troisième génération. Avec cette sensibilité, il est possible de mieux quantifier les états de thyrotoxicose (en distinguant les hyperthyroïdies sévères à TSH < 0,01 mUI/l, des hyperthyroïdies frustes ou sub-cliniques dont la TSH reste comprise entre 0,01 et 0,1 mUI/l), de mieux suivre la récupération hypophysaire lors du traitement de ces hyperthyroïdies, de mieux adapter les traitements freinateurs, de suivre les patients hospitalisés en mauvais état général...

Par contre le test ELISA TSH comme un test de deuxième génération a une sensibilité analytique de **< 0,10 mUI / l** et peut donc distinguer hyperthyroïdie de population euthyroïdien (12). Les échantillons présentant des concentrations de TSH supérieure à 30 mUI / l peuvent être diluées avec CAL A (0,0 mUI / l TSH) et retestés. Pour obtenir la multiplication de la concentration de l'échantillon par le facteur de dilution (le test normalisé selon l'OMS 2ème IRP pour la TSH).

Des résultats fiables et reproductibles sont obtenus lorsque le protocole du dosage est réalisé avec une parfaite compréhension du mode d'emploi contenu dans l'emballage de la trousse et avec le respect des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), ou autres lois nationales. Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test. Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées.

Conclusion

La thyroïde, c'est le gendarme de notre corps. Lorsqu'elle connaît des dysfonctionnements, c'est tout notre organisme qui se voit chamboulé : prise de poids, fatigue, constipation... dont **200 millions de personnes dans le monde sont touchées par des troubles de la thyroïde**, cette petite glande située à la base du cou qui régit l'ensemble de notre corps. Si on a un doute sur le bon fonctionnement de la thyroïde, c'est le bilan thyroïdien qui permettra de confirmer ou d'infirmier le diagnostique. Pour le patient, rien de bien contraignant : il s'agit d'une simple prise de sang. C'est généralement le médecin traitant qui la prescrit.

Par dosage immunologique de TSH on détecte l'anomalie de la thyroïde : si son taux est trop élevé (> 5 mUI/l) c'est que la personne est en hypothyroïdie : la thyroïde ne produit pas assez d'hormones et l'hypophyse essaie donc de la faire travailler davantage. A l'inverse, si le taux de TSH est très bas, ($< 0,3$ mUI/l) c'est que la thyroïde produit déjà trop d'hormones, l'hypophyse cesse donc de lui en commander : la personne est en hyperthyroïdie.

Le laboratoire du CHU Fès effectue le dosage de la **TSH** par la **méthode automates d'immuno-analyse (ARCHITECT i TSH)** car elle est plus sensible que le test ELISA et beaucoup plus sensible que les techniques physico-chimiques ou biologiques classiques.

Ce dosage permet le diagnostique et la mise en œuvre de surveillance des maladies thyroïdiennes.

Références bibliographiques :

- 1- Herbomez.M. MCU-PH, Pole de Biologie Pathologie Génétique, CHRU de Lille, BILAN BIOLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DE LA FONCTION THYROIDIENNE (http://biologiepathologie.chru-lille.fr/Formation_continue/Bilan_fonction_thyroidienne.pdf).
- 2- Antonia P. M. (2007) PCEM2- M16 – Régulation hormonale et chronobiologie – Physiologie des hormones – Physiologie de la glande thyroïde.
- 3- Ellakhdi.FE, Naamane.A. (2010) Bilan hormonal thyroïdien : proposition d'une fiche technique et contribution aux recommandations pour l'interprétation des variations et pièges, les technologies de laboratoire.
- 4- ADAM.A. (2003) La biologie clinique et la pharmacothérapie. *Maloine*.
- 5- VLAEMINK-GUILLEM. V. Structure et physiologie thyroïdiennes. *EMC Endocrinologie-Nutrition*, 10-002-B-10.
- 6- BRICAIRE.H, BAULIEU.E et LEPRAT.J. (1980) Glandes endocrines 3^{ème} édition. Flammarion-Médecine Science.
- 7- ANAES (Agence national d'accréditation et d'évaluation en santé) (2000). Diagnostic et surveillance biologique de l'hyperthyroïdie de l'adulte.
- 8- HERBOMEZ.M. (2009) Exploration biologique de la thyroïde. *Revue Francophone des laboratoires*, 441 : 39-44.
- 9- Duron. F. (2006) Endocrinologie, Niveau DCEM1 – Examen National Classant 2006-2007.
- 10- Clerc .J, Monpeyssen. H. (2003) *Revue du praticien*.
- 11-Barker. S. B. (1948) Determination of protein Bound Iodine, *Journal biological Chemistry* : 173, 175.
- 12-Chopra. I. J. (1971) Radioimmunoassay of thyrotropin, *J. Clinical Endocrinol.* 33, 865.

- 13-Sterling. L. (1975) Diagnosis and treatment of thyroid Disease, Cleveland CRC Press: 19 – 51.
- 14-Pierce JG. (1971)The Subunits of pituitary Thyrotropin. Their Relationship to other Glycoprotein Hormones. Endocrinology; 89:1331- 44.
- 15-Sterling. K. Lazarus .JH. (1977)The Thyroid and its control. Annu Rev Physiol; 39:349 -71.
- 16-Jackson .IMD. (1982)Thyrotropin-Releasing Hormone. N Engl J Me: 306: 145-55.
- 17-Spencer .CA. (1988) Clinical Uses and limitations of Rapid TSH Assays Medical Laboratory Products; 17-9.
- 18-Bayer. MF. (1987) Performance Criteria for Appropriate Characterization of “(Highly) Sensitive” Thyrotropin Assays. Clin Chem; 33: 630-1.
- 19-The national Academy of Clinical Biochemistry: Standards of Laboratory Practice. (1996) Laboratory Support for the Diagnosis & Monitoring of Thyroid Disease.
- 20-Ecochard. M. (2011) Endocrinologie de l’adolescent. Springer : 45-65.

Sites d’internet:

- 1- http://www.doctissimo.fr/html/sante/analyses/sa_380_thyreostimuline.htm
- 2- http://www.orbio.fr/catalogue_details.php?item_id=53&g=CANIN&t=analyse&c=Endocrinologie%20:%20thyro%EFde
- 3- <http://www.icilome.com/nouvelles/news.asp?id=61&idnews=12641>
- 4- <http://www.maghress.com/fr/lagazette/11519>
- 5- <http://www.medtronic.fr/votre-sante/thyroide/index.htm>

Glossaire

Cancer médullaire de la thyroïde

Cancer dérivé des cellules C. appelé aussi cancer à stroma amyloïde (termes provenant de descriptions anatomopathologiques)

Colloïde

Substance ressemblant à la colle, synthétisée par les cellules vésiculaires thyroïdiennes et stockée dans la lumière des follicules. Contient de la thyroglobuline et les précurseurs des Hormones thyroïdiennes.

Cellules folliculaires

=Follicular cells = cellules vésiculaires thyroïdiennes (anglicisme)

Chondrogenèse

Le cycle de la formation du cartilage, des chondrocytes, s'opposant en cela à la chondrolyse.

Euthyroïdie

La fonction thyroïdienne est normale

Glossaire

Dictionnaire donnant la signification de termes anciens ou peu connus

Test de Werner

Connu sous le nom de "Test FIFA" porte le nom de son concepteur. Il est très utilisé pour contrôler le niveau de forme des arbitres sportifs. Il remplace le test de Cooper jugé peu représentatif des efforts consentis par un arbitre au cours d'un match

VO₂

Le volume d'**oxygène** qu'un organisme **aérobie**, en général, ou le sujet humain en particulier peut consommer par unité de temps lors d'un exercice dynamique aérobie maximal.



RÉSUMÉ

La glande thyroïde est une glande de quelques grammes située à la base du cou. Elle sécrète des hormones (T3, T4) essentielles au métabolisme et à la croissance, régulant aussi de nombreuses fonctions de l'organisme. Si on a un doute sur le bon fonctionnement de la thyroïde, c'est le bilan thyroïdien qui permettra de confirmer ou d'infirmer le diagnostic et qui nécessite un dosage immunologique de TSH, le paramètre le plus précieux pour l'appréciation de la fonction thyroïdienne, pour détecter l'anomalie thyroïdienne (hyperthyroïdie, hypothyroïdie...).

Parmi les techniques existantes pour le dosage de TSH, on trouve :

- ❖ Le test ELISA pour la détermination quantitative de TSH dans le sérum humain qui est un test de deuxième génération présentant une sensibilité analytique de **< 0,10 mUI / l.**
- ❖ Le dosage par l'automate Architect i pour la détermination quantitative de TSH : un dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescente (CMIA) qui atteint une sensibilité fonctionnelle **de 0,01 mUI/l ou moins** ce qui permet de mieux quantifier les états thyroïdiens.

Malgré leur grande fiabilité, il existe toujours des causes d'interférences ou d'artéfacts. Il faut donc rester critique devant les résultats. Le dialogue clinicien-biologiste est essentiel.