

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
Dr BOUZIANI .Nessim

Année universitaire: 2013-2014
REMERCIEMENTS

Au Dr MEGHELLI Sidi Mohammed, maître assistant en biophysique, responsable de l'unité d'explorations in-vitro du service de médecine nucléaire de Tlemcen.

Nous vous remercions d'avoir sacrifié de votre temps et de nous avoir guidé dans l'élaboration de ce mémoire, avec compétence, gentillesse et générosité. Qu'il nous soit permis de vous exprimer ici, nos vifs remerciements .

Au Dr BOUZIANI Nessim, maître assistant en épidémiologie.

Votre savoir et votre compétence nous ont permis de valoriser les résultats de ce travail .Nous vous exprimons toute notre reconnaissance et notre considération.

Au Dr LACHACHI Boumediene, assistant en médecine nucléaire.

Vous nous avez toujours encouragé, votre dynamisme, votre simplicité nous ont séduit et servi d'exemple.

Au Dr TAHRAOUI Zoubir, assistant en médecine nucléaire.

Pour son implication et son aide, nous avons apprécié son enthousiasme.

Nous remercions tout le personnel du laboratoire du service de médecine nucléaire de Tlemcen pour leur gentillesse et leur coopération, particulièrement le **Dr Abderrahim Khaoula** doctorante en physio-pathologie animale.

Enfin, le corps enseignant de la Faculté de médecine, Université Abou Bekr Belkaid :

Pr BERBER Necib, Doyen et Chef de service de médecine nucléaire de Tlemcen.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/
Pr BABA AHMED Abderezzak, Chef du département de Pharmacie.

Un hommage respectueux.

Dr ABOUREJAL Nessrine , adjoint –chef du département de Pharmacie .

Pour sa présence, sa compétence, sa qualité d’esprit qu’elle fait régner autour de ses étudiants et ses précieux conseils. Nous lui exprimons toute notre considération.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	6
II. P A R T I E	
THEORIQUE	7
A.La thyroïde	8
1. Anatomie	8
2. Histologie	9
3. Structure des hormones thyroïdiennes	10
4. Hormonosynthèse	11
5. Régulation de la fonction thyroïdienne	12
6. Mécanismes d’action des hormones thyroïdiennes.....	13
B.Cancer de la thyroïde	13
1. Différents cancers.....	14
1 Le cancer papillaire	14
2 Le cancer vésiculaire	14
3 Le cancer médullaire	15
2. Présentation clinique	15
3. Explorations diagnostiques d’un nodule thyroïdien, à la recherche d’un cancer.....	16

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/

1	« Cytoponction » Examen cytologique du produit de cytoponction à l'aiguille fine...	16
2	Echographie.....	16
3	Scintigraphie thyroïdienne.....	17
4.	Exploration biologique.....	17
1	TSH	17
2	T circulante.....	17 g
3	Calcitonine.....	18

C. Thyroglobuline.....18

1.	Structure.....	19
2.	Relation cancer thyroïdien – hTg.....	20

D. Anticorps anti-hTg.....20

E. Méthodes de dosages de la hTg.....22

1.	Méthodes des dosages immunologiques.....	22
1	Classification des méthodes de dosages immunologiques.....	22
2	Méthodes non isotopiques	22
a.	ELISA	22
b.	Les techniques immunochimiques.....	23
2.	Principes généraux du dosage radio immunologique.....	24

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/

1	Introduction.....	24
2	Les dosages radioimmunologiques	25
a.	Dosage par compétition :RIA.....	25
b.	Dosage Radio Immunométrique : IRMA.....	26
c.	Protagonistes du dosage.....	27
c.1	préparation du substrat marqué	27
c.2	préparation du réactif	28
c.3	courbes d'étalonnage et étalons	28
c.4	techniques de séparation	29
3.	Dosage de la hTg.....	29
4.	Problématique analytique.....	31
a.	Différences de standardisation	32
b.	Sensibilité des techniques	33
c.	Reproductibilité inter-séries	34
d.	Présence de l'effet crochet	34
e.	Interférences par les auto-anticorps	35
	Quelques solutions proposées	35
•	Évaluation quantitative de l'ARNm de la thyroglobuline.....	35
•	Comparaison hTg-rh TSH et hTg-hypo	35

III. PARTIEPRATIQUE

.....38

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

1. Introduction-Problématique.....	39
2. Objectif de l'étude.....	40
3. Matériels et méthode.....	40
4. Résultats.....	42
5. Discussion- Conclusion.....	46

ABRÉVIATIONS

CT: Calcitonine

hTg : Thyroglobuline

ACT : Anticorps anti thyroglobuline

TPO: Anticorps anti-peroxydase

RIA : Radio immuno assay

IRMA :Immuno radiometric assay

RI: Radio immunologique

IMA :Méthodes immuno-métriques

CDT : Carcinome différencié de la thyroïde

Ac : Anticorps

Ag: Antigène

¹²⁵ I :Iode 125

B : Bound (radioactivité de la fraction liée)

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
F: Fraction libre de l'Ag

T : Radioactivité totale

rhTSH : TSH humaine recombinante

INTRODUCTION

L'incidence apparente des cancers thyroïdiens augmente régulièrement, en raison d'une meilleure détection précoce de la maladie.

Des progrès importants ont été accomplis, tant dans les techniques de diagnostic tels que la cytologie et l'échographie, beaucoup plus sensibles et plus précises qu'auparavant, que dans les techniques thérapeutiques où le traitement implique l'ablation de la thyroïde par une intervention chirurgicale souvent complétée par l'administration d'iode 131. Cette ablation impose par la suite de prendre tous les jours, un médicament qui remplace la production naturelle des hormones thyroïdiennes. Il en est de même pour le suivi après le traitement initial par le dosage de la thyroglobuline.

Le registre des cancers de Tlemcen^[1] rapporte que le cancer de la thyroïde occupe la deuxième position après le cancer du sein chez la femme. 10 nouveaux cas en moyenne sont enregistrés chaque semaine au service de médecine nucléaire du CHU Tlemcen qui occupe

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
une place prépondérante dans la prise en charge du cancer thyroïdien dans la région ouest d'Algérie. Cette prise en charge est non seulement portée sur le volet thérapeutique (irathérapie) mais aussi sur le volet diagnostic et particulièrement le suivi biologique par le dosage de ce marqueur tumoral.

Nous avons comparé, à travers cette étude, deux trousse de dosage radio immunologique de la hTg, de deux fournisseurs différents, dans l'optique d'une comparaison de leurs performances analytiques.

PARTIE THEORIQUE

A-La Thyroïde :

1. Anatomie :

La thyroïde est une glande endocrine située dans la région cervicale médiane basse, formée de deux lobes reliés par un isthme, pesant entre 15 et 30 g.

Elle est organisée en follicules d'un diamètre moyen de l'ordre de 200 micromètres (50 à 500). Les follicules sont formés par un épithélium simple de cellules folliculaires (thyrocytes) délimitant une cavité - l'espace folliculaire - contenant la substance colloïde. Les thyrocytes, responsables de la synthèse des hormones thyroïdiennes, représentent plus de 99 % des cellules de la glande.

Il s'agit de cellules bipolaires (pôle basal et pôle apical) à double fonctionnement : exocrine vers la cavité folliculaire et endocrine vers la circulation sanguine.

La thyroïde comporte par ailleurs des cellules claires ou para folliculaires responsables de la synthèse de thyrocalcitonine. [2]

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

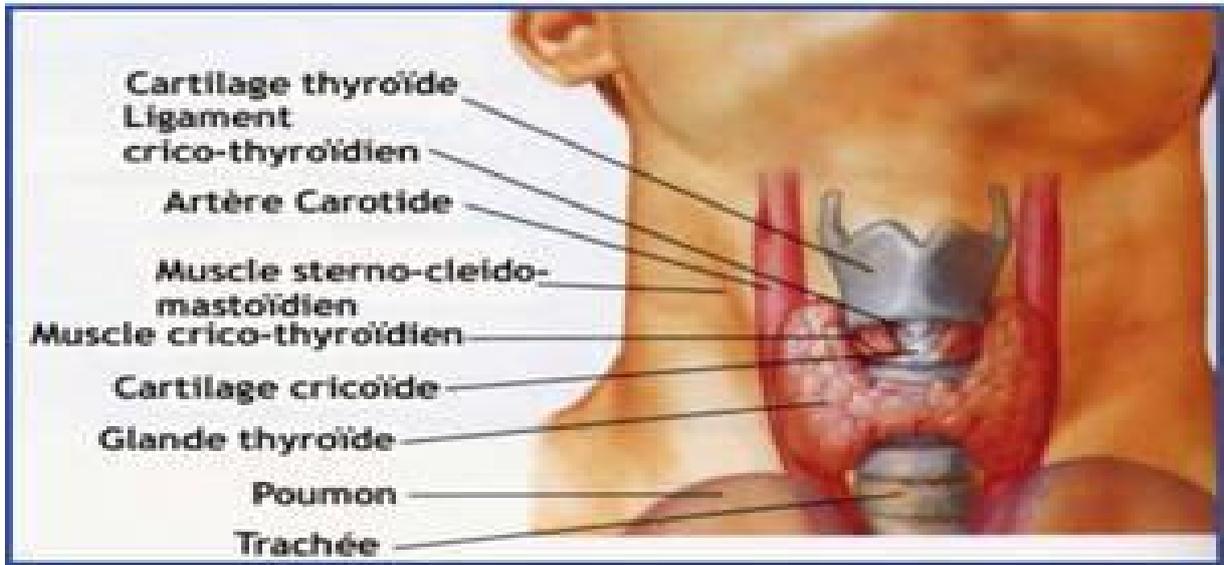


Schéma anatomique de la thyroïde

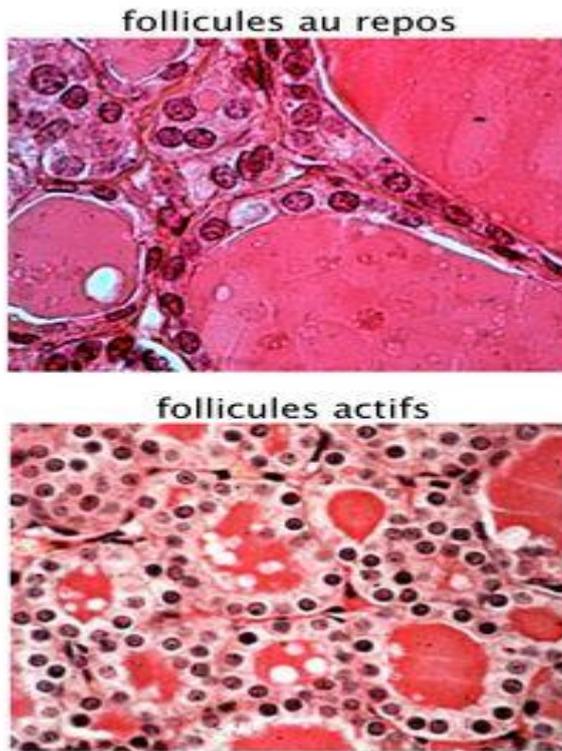
2. Histologie :

La thyroïde constituée de structures sphériques, les follicules thyroïdiens, eux-mêmes situés au sein d'un stroma conjonctivo-vasculaire riche en capillaires sanguins fenêtrés.

Les follicules thyroïdiens sont formés d'un épithélium simple entourant une substance pâteuse et jaunâtre à l'état frais : la colloïde.

L'épithélium des follicules thyroïdiens repose sur une lame basale et comporte deux types de cellules : d'une part les cellules folliculaires encore appelées thyrocytes et qui sécrètent les hormones thyroïdiennes T3 et T4 et d'autre part les cellules C qui sécrètent la calcitonine.[2]

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
les cellules folliculaires (ou thyrocytes) :

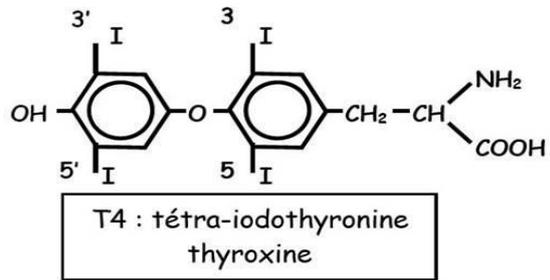
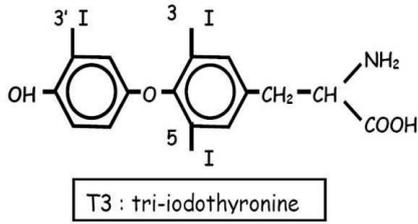


[3]

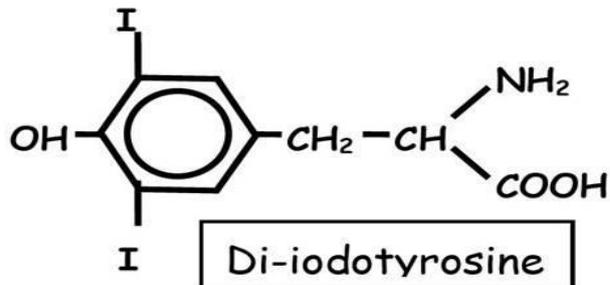
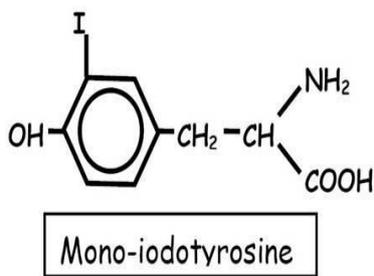
3. Structure des hormones thyroïdiennes :

Les hormones thyroïdiennes possèdent une même structure organique : 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.

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/



T3 reverse (forme inactive)

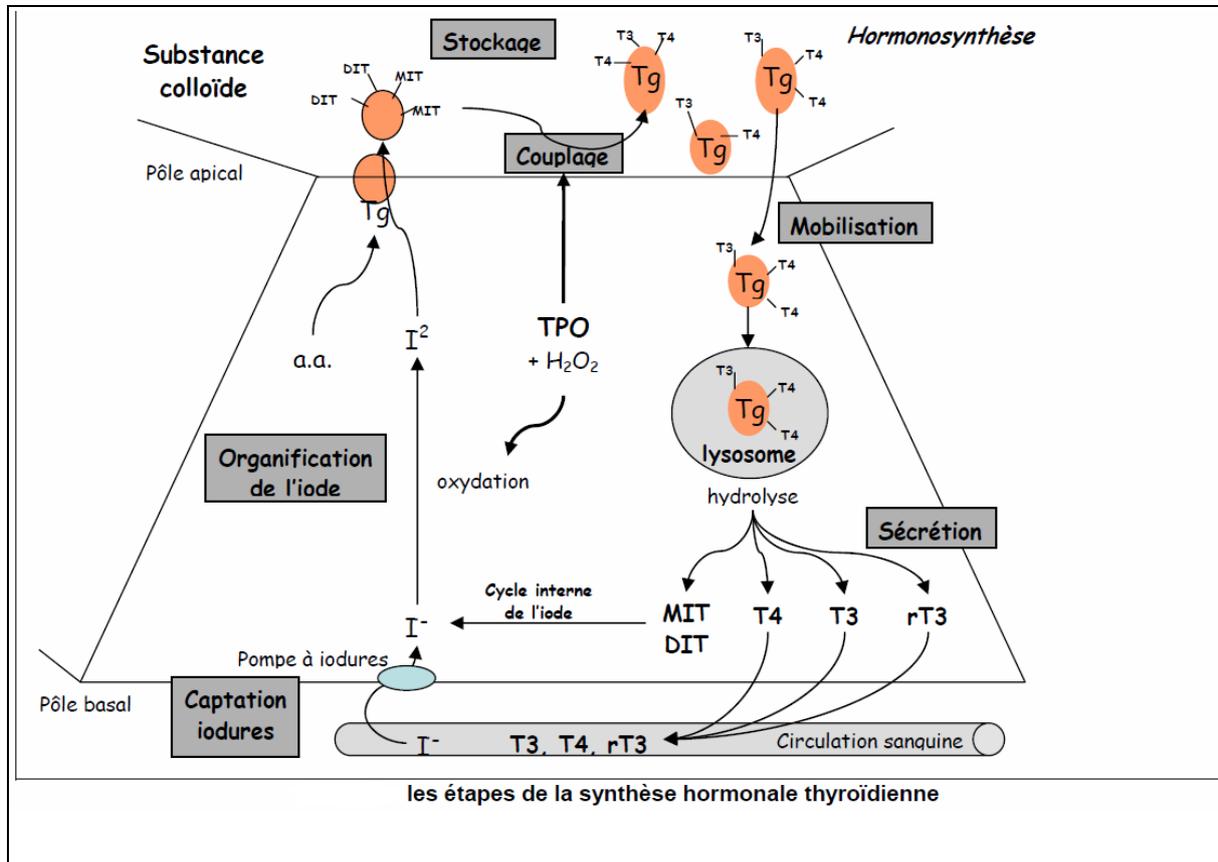


structure des hormones thyroïdiennes et de leurs précurseurs^[2]

4. Hormonosynthèse :

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/

Elle comporte les étapes suivantes schématisées ci-dessous :



L'iode est un oligo-élément relativement rare, dont les réserves sont faibles dans l'organisme (10 à 20 mg dans la thyroïde).

Les besoins varient selon l'âge : de l'ordre de 100 microgrammes par jour chez l'enfant, 100 à 150 µg /j chez l'adolescent et l'adulte et de 100 à 300 µg /j durant la grossesse et l'allaitement. Ils devraient être couverts par les apports alimentaires (poissons, crustacés, laitages et sels iodés).

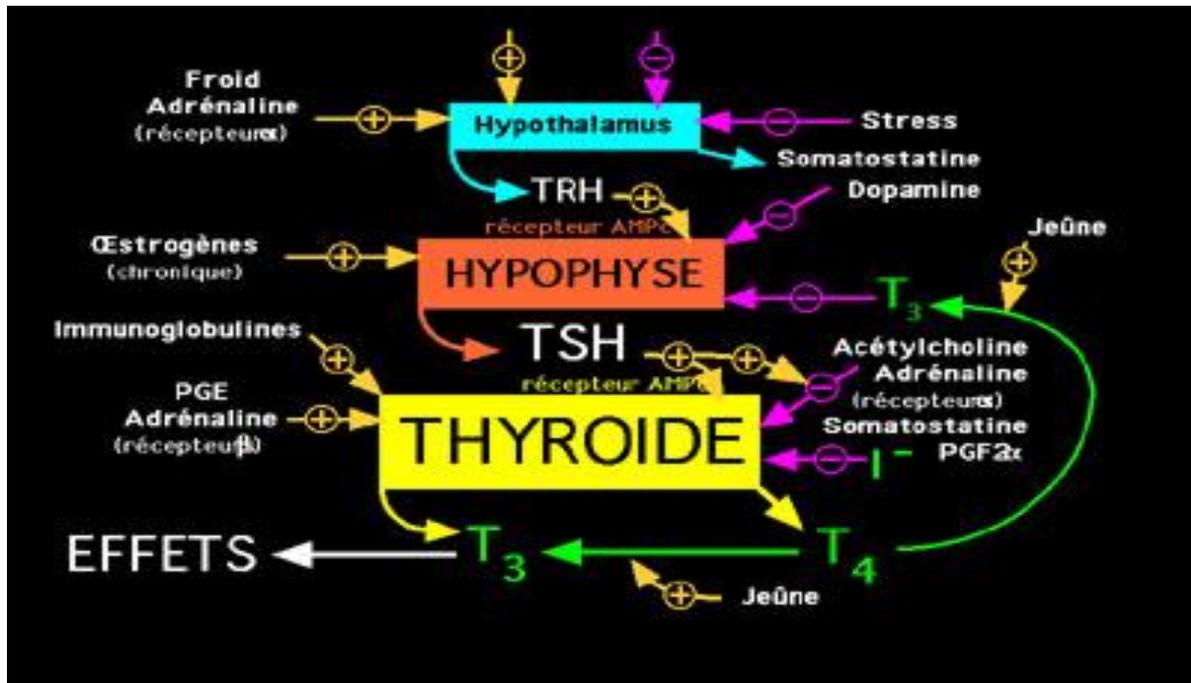
La première étape est donc celle de la capture d'iodures circulants à l'aide d'une pompe spécifique, selon un mécanisme actif, ATP-dépendant (avec co-transport sodique), saturable (étape limitante), et imparfaitement sélective (passage possible de perchlorate, de brome, de pertechnetate, qui marqué au technétium 99 est utilisé pour faire des scintigraphies thyroïdiennes....).

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
L'organification (oxydation) de l'iode nécessite la présence d'une enzyme spécifique liée à la membrane, la thyroperoxydase (TPO), dont l'activité optimale requiert la présence d'H₂O₂. L'iode ainsi oxydé peut se lier aux résidus tyrosyl de la thyroglobuline (hTg), volumineuse glycoprotéine (660 kD), donnant naissance aux précurseurs des hormones thyroïdiennes : mono-iodo-tyrosine (MIT) et des di-iodo-tyrosine (DIT). L'iodation de la Tg se fait au pôle apical, dans la substance colloïde.

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), la récupération se faisant par pinocytose en fonction des besoins périphériques. La sécrétion des hormones thyroïdiennes se fait après hydrolyse lysosomiale[2,5]

5. Régulation de la fonction thyroïdienne :

L'axe thyroïdien est résumé dans la figure :



Régulation des hormones thyroïdiennes[4]

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/

La TSH agit à différents niveaux :

- Contrôle et stimulation de l'hormonosynthèse.
- Régulation de l'expression et de la synthèse de la hTg, des pompes à iodures et de la TPO.
- Facteur de croissance pour la thyroïde.

L'autorégulation thyroïdienne correspond à des mécanismes transitoires :

- Si peu d'iode=>thyrocytes très sensibles.
- Si trop d'iode=>blocage de l'iodation et de la sécrétion d'iode.
- Enfin, la captation d'iode est d'autant plus forte et plus prolongée que la glande est pauvre en iode et inversement

L'état nutritionnel :

A jeûn, dénutrition ou hypercatabolisme=>diminution de taux sanguins de T3 et augmentation de T3 reverse (par inhibition enzymatique).[4]

6. Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes[2,4] :

Actions nucléaires	Actions extranucléaires
Régulation de l'expression génique	Action membranaire (potentialisation de récepteurs adrénergiques et des pompes ioniques) Mitochondrie (augmentation de la calorigénèse et de la VO ₂)

B- Cancer de la thyroïde :

1. Différents cancers :

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Les cancers de la glande thyroïde sont rares (1% environ de l'ensemble des cancers).

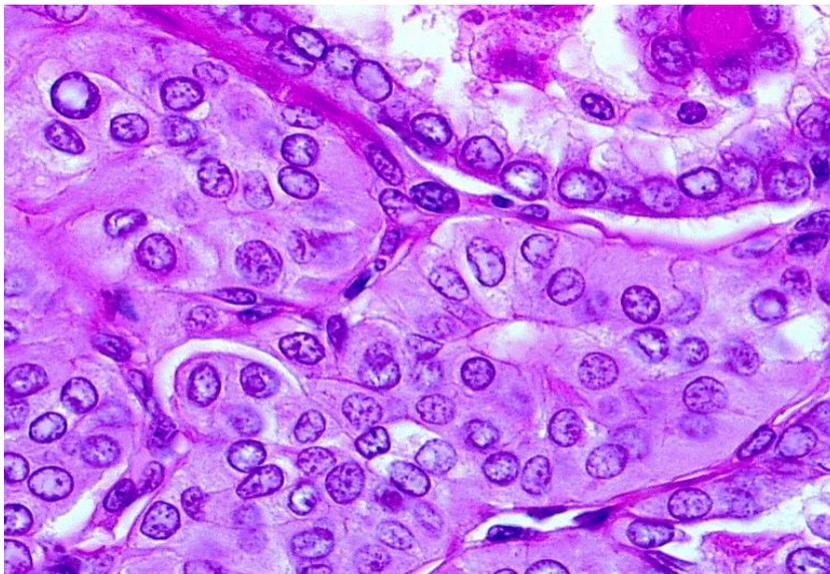
Il existe différents types de cancer : les cancers différenciés, les carcinomes médullaires développés à partir des cellules C et les carcinomes peu ou indifférenciés (anaplasiques).

Les cancers différenciés de souche folliculaire se présentent sous forme d'un nodule isolé et palpable. Ils sont associés à un bon pronostic (taux de survie supérieur à 95% à 20 ans).).[4]

1 Le cancer papillaire :

Représente 70 % des cancers thyroïdiens. Les cellules tumorales ont des anomalies nucléaires caractéristiques, sur lesquelles repose le diagnostic. .[6,7,8]

Le cancer papillaire est souvent multifocal. Son évolution est généralement lente et loco-régionale : intra-thyroïdienne et lymphatique. Environ 65% des patients porteur d'un carcinome papillaire (>10mm) ont des métastases ganglionnaires cervicales lors du diagnostic.).[4]

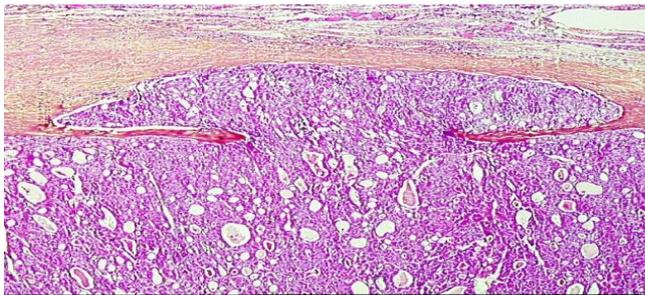


Coupe anatomo-pathologique du cancer papillaire

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

2 Le cancer vésiculaire :

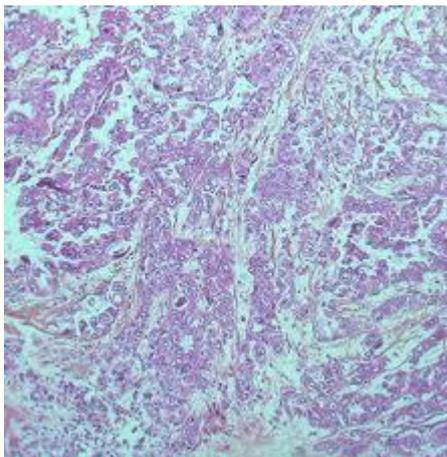
Représente 20 % des cancers thyroïdiens. Les anomalies nucléaires du cancer papillaire sont absentes, l'architecture est vésiculaire. A l'opposé du cancer papillaire les métastases se font fréquemment par voie hématogène (poumons, os, cerveau), plutôt que lymphatique.).[4]



Coupe anatomo-pathologique du cancer vésiculaire

3 Le cancer médullaire :

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est un cancer rare qui se développe aux dépens des cellules C parafolliculaires thyroïdiennes responsables de la sécrétion de calcitonine.).[4]



Coupe anatomo-pathologique du cancer médullaire

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

2. Présentation clinique : [4]

On admet qu'un nodule thyroïdien ne doit être pris en compte que s'il atteint 1cm et il est alors peu évolutif, de consistance variable, généralement ferme et le plus souvent palpable sauf particularités anatomiques. Dans ce cas, il est alors découvert fortuitement par échographie.



La thyroïde est une petite glande à explorer d'abord par la palpation

- Plus rarement un cancer thyroïdien différencié peut être découvert par une métastase à distance (d'un cancer vésiculaire).

3. Explorations diagnostiques d'un nodule thyroïdien, à la recherche d'un cancer

1 « Cytoponction » Examen cytologique du produit de cytoponction à l'aiguille fine :

L'examen se fait par ponction du nodule (sans anesthésie) avec une aiguille très fine, puis aspiration et étalement sur lame. Si le nodule est difficile à palper la ponction doit être guidée par échographie. la cytoponction est le meilleur examen pour distinguer un cancer d'un nodule bénin .Très performante pour le carcinome papillaire (grâce aux anomalies nucléaires), elle peut être prise en défaut dans les carcinomes vésiculaires, et médullaires.

2 Echographie

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Les cancers thyroïdiens sont presque toujours hypoéchogènes. Cependant la plupart des nodules thyroïdiens (bénins et malins) sont hypoéchogènes. Le caractère hypoéchogène a donc une bonne sensibilité, mais une très faible spécificité pour le diagnostic de cancer thyroïdien.

Cependant l'échographie garde un intérêt : elle permet de découvrir des nodules > 1cm mais non palpables pour des raisons anatomiques. Elle est nécessaire pour guider la cytoponction des nodules difficiles ou impossible à palper.

3 Scintigraphie thyroïdienne

Les carcinomes thyroïdiens sont capables de capter de l'iode, mais beaucoup moins que le tissu thyroïdien avoisinant : ce sont presque toujours des nodules hypofixants, c'est à dire « froids » Cependant 80% des nodules thyroïdiens (bénins et malins) sont froids : il est faux de considérer qu'un nodule froid a un risque élevé d'être un cancer. Comme le caractère hypoéchogène en échographie, le caractère « froid » en scintigraphie a une bonne sensibilité, mais une très faible spécificité pour le diagnostic de cancer thyroïdien. Les nodules chauds (iso ou hyperfixants) ont un risque très faible d'être un cancer. Se souvenir que parmi ces nodules chauds les nodules toxiques (hyperfixant et extinctifs) peuvent être facilement dépistés par le dosage de la TSH, qui est toujours abaissée.

Au total la scintigraphie a peu d'intérêt dans le diagnostic du cancer thyroïdien

4. Exploration biologique

1 TSH :

Dans les cancers, elle est généralement normale, car les cancers thyroïdiens synthétisent peu ou pas d'hormones thyroïdiennes (donc pas d'hyperthyroïdie) et il est très rare qu'ils

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
détruisent tout le parenchyme thyroïdien normal (donc pas d'hypothyroïdie). Cependant il peut arriver qu'un patient soit porteur à la fois d'un cancer thyroïdien et d'une dysthyroïdie.

2 Thyroglobuline circulante

Les carcinomes thyroïdiens différenciés secrètent de la hTg, mais pas plus que les thyrocytes normaux. Le dosage de la hTg n'a donc aucun intérêt pour le diagnostic de malignité d'un nodule : avant thyroïdectomie ce dosage est inutile. Par contre après thyroïdectomie totale (suivi d'une destruction isotopique des reliquats) pour cancer le différencié, la hTg constitue un excellent marqueur tumoral pour le suivi.

En effet, si le patient a une sécrétion détectable de thyroglobuline alors qu'il n'a plus de thyroïde, c'est qu'il y a une récurrence ou métastase. Pour que le dosage de thyroglobuline soit interprétable il faut s'assurer de l'absence d'anticorps anti-Thyroglobuline, qui peuvent interférer dans le dosage et être à l'origine de faux négatifs. Le dosage d'anticorps anti thyroglobuline doit donc être demandé systématiquement en même temps que le dosage de la hTg.

3 Calcitonine

La calcitonine a une très grande sensibilité pour une forme rare de cancer de la thyroïde, le cancer médullaire. Le cancer médullaire n'est pas classé dans les cancers « différenciés » de la thyroïde car il n'est pas développé à partir des thyrocytes, mais, à partir des cellules C, qui secrètent de la calcitonine. Le dosage de la Calcitonine est également d'une assez bonne spécificité pour le cancer médullaire, ce qui fait qu'il est supérieur à la cytoponction pour ce diagnostic rare.)

C- Thyroglobuline

C'est une glycoprotéine iodée de très grand poids moléculaire 670 kDa.

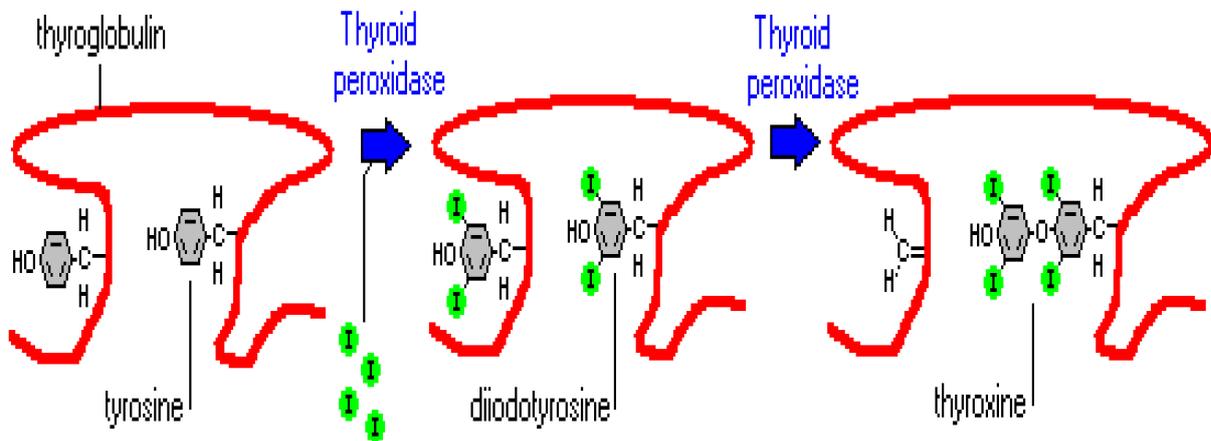
Elle est synthétisée dans les cellules folliculaires des vésicules colloïdes de la glande thyroïde.

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Elle est sécrétée par les cellules basales de ces vésicules. Elle contient l'immense majorité de l'iode de la glande thyroïde (90 à 95%).

C'est le mode de stockage des hormones thyroïdiennes, que sont la T₃ et la T₄. La synthèse et la transformation de la thyroglobuline en T₃ et T₄ est sous la dépendance de la thyroïdostimuline (TSH). Son taux normal est inférieur à 60 nanogrammes par ml

On estime que (lorsque la sécrétion de TSH est normale) 1 à 2 ng/ml de thyroglobuline sérique correspondent à 1 gramme de tissu thyroïdien. La concentration de thyroglobuline reflète principalement la masse de tissu thyroïdien, le degré de stimulation des récepteurs de la TSH et les phénomènes inflammatoires.



La thyroglobuline et sites d'iodation

La synthèse : de la thyroglobuline s'opère par assemblage successif d'acides aminés le long des ribosomes du réticulum endoplasmique.

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

L'iodation des tyrosines se situe après assemblage de la molécule de thyroglobuline.

1. Structure:

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

La thyroglobuline est stockée dans la lumière folliculaire où elle constitue 90 % des protéines de la colloïde. Elle contient de l'iode sur les résidus tyrosyls. Les sites d'iodations les plus précoces sont situés en 5 points bien précis. Il est à noter que 44 % de la T4 et 25 % de la synthèse de T3 sont réalisés au niveau du site Tyr5 (extrémité N terminale). Plusieurs espèces de hTg sont connues aujourd'hui, en particulier la Tg humaine et la hTg porcine qui ont 77 % d'homologie.[5]

2. Relation cancer thyroïdien – hTg :

La thyroglobuline est un marqueur des cancers différenciés de la thyroïde. Son taux est souvent élevé dans ce cas.

Après thyroïdectomie totale et sous traitement freinateur par la L thyroxine, la présence d'un taux décelable de thyroglobuline signe la présence d'un reliquat de tissu thyroïdien, sain ou cancéreux.

Un examen à l'iode 131 doit être fait à la recherche d'éventuelles métastases.

La présence fréquente d'auto-anticorps antithyroglobuline (chez 20 % de ces patients) peut abaisser de façon artificielle les résultats de ces dosages.

Cette interférence est à rechercher systématiquement par un test de recouvrement. (le dosage du sérum du patient surchargé par une quantité connue de thyroglobuline doit permettre de retrouver 80 à 120 % de la thyroglobuline à doser) .C'est la seule méthode pour avoir une valeur pronostique fiable. Enfin il faut savoir que l'interprétation du dosage de la thyroglobuline dans le suivi d'un cancer thyroïdien différencié ne peut se faire qu'en fonction du contexte clinique (ablation partielle ou totale de la glande) et biologique (taux de

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
TSH).[3],[17],[18],[19]

D- Anticorps anti-hTg :

La thyroglobuline (Tg) est produite dans la glande thyroïde et constitue le composant principal de la colloïde folliculaire. Elle joue, avec la thyro peroxydase (TPO), un rôle essentiel dans l'iodation de la L-tyrosine, permettant la synthèse des hormones thyroïdiennes T4 et T3. Comme la TPO, la Tg est un autoantigène potentiel. Lors de thyroïdite avec participation auto-immunitaire, le taux sérique d'auto-anticorps anti-Tg augmente. Des concentrations élevées en anticorps anti-Tg et anti-TPO sont un indicateur de thyroïdite avec infiltration lymphocytaire (thyroïdite d'Hashimoto). La fréquence d'autoanticorps anti-Tg est d'env. 70 à 80% lors d'auto-immunité thyroïdienne (thyroïdite d'Hashimoto incluse) et d'env. 30% lors de maladie de Basedow. Le dosage des anticorps anti-Tg est une aide importante dans le suivi de thyroïdites d'Hashimoto et le diagnostic différentiel (suspicion de maladie thyroïdienne auto-immune à anti-TPO négatifs, maladie de Basedow sans infiltration lymphocytaire, exclusion de l'interférence des auto- anticorps anti-hTg lors de dosages de Tg). Même si la sensibilité de la méthode peut être augmentée par le dosage en parallèle d'autres anticorps thyroïdiens (anti-TPO, anti-récepteur de la TSH), un résultat négatif ne permet pas d'exclure la présence d'une maladie auto-immune. Le taux d'anticorps ne corrèle pas avec l'activité clinique de l'affection. Des titres d'anticorps initialement élevés, peuvent redescendre à la normale après une période prolongée de la maladie tout comme lors de rémission. La réapparition d'anticorps après rémission est un indicateur probable de récurrence. [3]

Antigène thyroïdien :

La Tg est une protéine fortement antigénique. C'est le principal auto-antigène thyroïdien ; la fréquence des auto-anticorps anti-hTg est importante.

La molécule exprime au moins 40 déterminants antigéniques ; une douzaine d'épitopes est bien identifiée.[19] Les techniques classiques de l'immunologie (inhibition de liaison,

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
réactivité croisée) ont permis de déterminer une carte épitopique de la molécule.

La région centrale est majoritairement immunoréactive. Elle est dosée par méthode immunométrique à anticorps monoclonaux ou par chimiluminescence.

Un taux élevé : peut être en rapport avec:

- une hyperthyroïdie
- une hyperplasie (goitre simple, nodule tissulaire)
- une infiltration inflammatoire auto-immune(thyroïdites)
- une désorganisation tissulaire (cancer)
- une grossesse
- une maladie de Basedow (anticorps anti-récepteurs de la TSH).

Un taux bas : en l'absence d'anticorps anti-thyroglobuline, peut être en rapport avec:

- une suppression de sécrétion de TSH , dûe à des apports de T 3 / T 4 thérapeutiques, ou à une insuffisance hypophysaire .
- une athyréose congénitale ou secondaire à une ablation totale de la thyroïde.[5],[17],[18],[19]

E- Méthodes de dosages de la hTg :

1. Méthodes de dosages immunologiques

1 Classification des méthodes de dosages immunologiques

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Traceur	Dosage avec compétition (anticorps limitant)	Dosage sans compétition (anticorps en excès)
Radiomarqué	Radioimmunoassay (RIA)	Immunoradiometric assay (IRMA)
Enzyme	Enzymoimmunoassay (EIA)	Enzyme-labeled immunosorbent assay (ELISA)
Fluorescent	Fluoroimmunoassay (FIA)	Immunofluorometric assay (IFMA)
Luminescent Chimio luminescent	Luminoimmunoassay (LIA) Chimioluminoimmunoassay(CLIA)	Immunoluminometric assay (IFLA) immunochemiluminometric assay (ICMA)

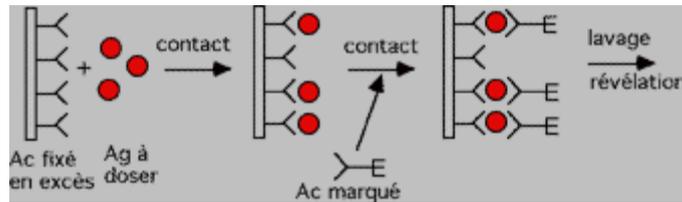
Les dosages relatifs à la Tg sont non isotopiques (ELISA ,ICMA) et isotopiques (RIA, IRMA) ces derniers seront développés ultérieurement.

2 Méthodes non isotopiques :

- a. ELISA :La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Dosage d'un antigène par méthode ELISA

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/



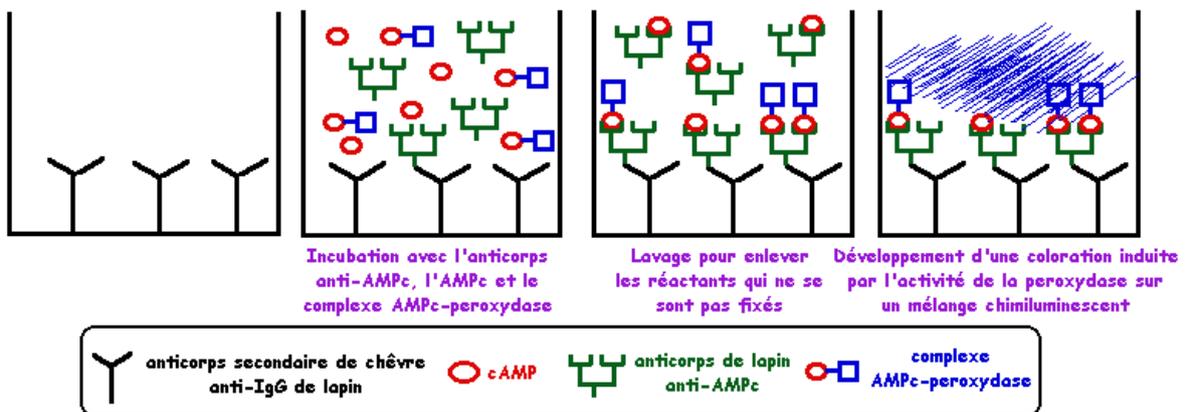
b. Les techniques immunochimiques

Le but de l'immunochimie est de révéler une molécule biologique présente sur une cellule ou un tissu avec des anticorps spécifiques.

- immunohistochimie : l'échantillon est une coupe de tissu
- immunocytochimie : l'échantillon est une préparation cytologique

Principe : un anticorps primaire est fixé sur un antigène. On révèle cet anticorps avec un second anticorps dirigé contre la classe d'immunoglobuline à laquelle appartient l'anticorps primaire.

Des particules d'or ("*immunogold*") ou une enzyme qui catalyse une réaction colorimétrique (exemple : la peroxydase) sont fixées sur l'anticorps secondaire. [16]



E. Jaspard (2005)

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Le milieu de développement de la chimiluminescence contient du luminol (3-aminophthalhydrazide), du 4-iodophenol et de l'eau oxygénée.

Des radicaux libres sont formés par l'action de la peroxydase sur l'eau oxygénée.

Ces radicaux libres réagissent avec le luminol qui émet alors des photons de fluorescence de longueur d'onde 425 - 445 nm.

Des techniques de couplage à l'enzyme de révélation permettent d'augmenter la sensibilité du dosage en diminuant la limite de détection.

2. PRINCIPES GENERAUX DU DOSAGE RADIO IMMUNOLOGIQUE

1 Introduction :

Le dosage radioimmunologique (RI) représente un progrès important en biologie.

Le 1^{er} dosage a été celui de l'insuline en 1959 par Berson et Yalow, ce qui leur a valu le prix Nobel en 1977.

Les disciplines qui en ont bénéficié sont l'endocrinologie, la pharmacologie, la cancérologie...

On a pu doser des substances de concentrations de l'ordre du picogramme/ml.

Le principe général repose sur l'utilisation :

De la réaction Ag-Ac et sa spécificité

Des méthodes radioactives et de leur sensibilité.

Les dosages RI sont classés en deux groupes, selon les proportions relatives d'Ac et d'Ag présentes dans la réaction, on distingue :

Le dosage RI classique ou RIA, dosage par compétition, en défaut d'Ac

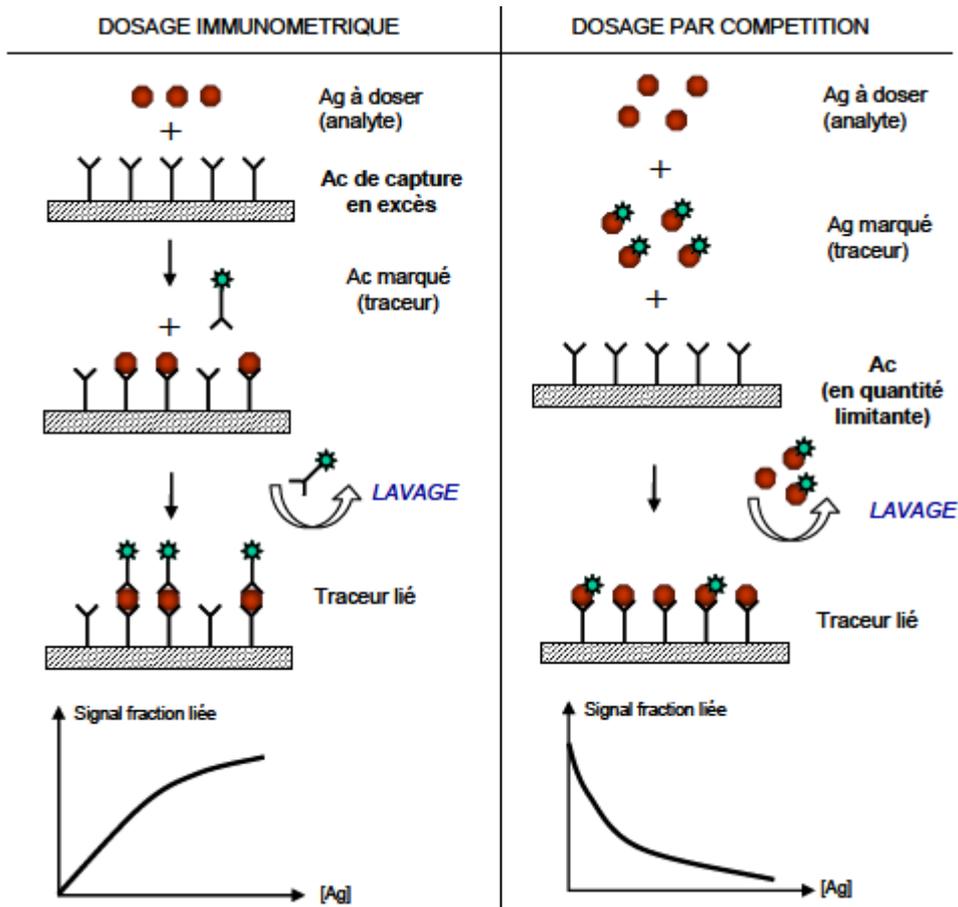
Le dosage immunoradiométrique ou IRMA, en excès d'Ac.

Word to PDF - UnRegistered
<http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

2 Les dosages radioimmunologiques :

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/



a. Dosage par compétition :RIA

Appelé également : dosage par défaut d'Ac, dosage d'évincement ou d'inhibition.

Des molécules marquées et des molécules non marquées vont entrer en compétition vis-à-vis d'un nombre limité de sites d'Ac.

Dans le dosage RI, l'Ag est marqué par un isotope radioactif pour quantifier la réaction Ag-Ac.

En pratique on met en présence :

L'Ag à doser

Le même Ag radio marqué

L'Ac dirigé contre cet Ag.

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/

C'est la compétition entre une quantité définie d'Ag marqué et un Ag déterminé sur une quantité définie d'Ac, ces Ac étant en quantité insuffisante par rapport aux Ag.

On aura formation de complexes Ag-Ac et Ag*-Ac, les concentrations des Ac et des Ag étant fixes, l'augmentation de la concentration en Ag entraîne l'augmentation de la concentration en complexes Ag-Ac.

Si l'on dispose d'une méthode permettant de séparer sans modifier l'équilibre de la réaction, les composés libres(F) des complexes liés Ag-Ac (B) et Ag*-Ac (B*), on peut déterminer grâce au signal délivré par le marqueur la concentration de l'Ag marqué libre(F*) et du complexe B* pour chaque concentration de l'Ag.

Ces concentrations sont à l'équilibre dans le même rapport que les concentrations des fractions F et B de l'Ag non marqué.

On a donc pour toutes les concentrations de l'Ag : $B/F=B^*/F^*$

La concentration de l'analyte est obtenue par lecture sur une courbe d'étalonnage.

Avantages	Inconvénients :
S'appliquent à tous les Ag, quelque soit leur taille, en particulier pour les haptènes, ceux-ci ne possèdent qu'un seul épitope.	Nécessitent une constante d'affinité élevée de l'Ac pour l'Ag pour obtenir une limite de détection faible et un nombre constant de sites Ac dans chaque tube de réaction pour avoir une bonne précision. Puisqu'un seul épitope suffit à la réaction, on peut avoir des réactions croisées : La TSH, FSH, LH, HCG ont en commun une sous unité alpha. Tout Ac qui reconnaît un épitope commun reconnaît les 4 hormones Un Ac peut reconnaître non seulement l'Ag recherché mais aussi son précurseur ou ses métabolites porteur de l'épitope.

b. Dosage Radio Immunométrique : IRMA

Depuis l'avènement des Ac monoclonaux, l'IRMA a remplacé la méthode par compétition.

Elle se caractérise par :

La présence d'Ac en excès

L'utilisation d'un 2eme Ac marqué

Donc 2 Ac dirigés contre 2 épitopes suffisamment éloignés de la molécule d'Ag.

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/

Le 1^{er} Ac (Ac liant) est fixé sur un support solide (tubes billes..)

Le 2^e Ac marqué à l'125I (Ac traceur)

La molécule à tester est prise en sandwich entre les 2 Ac

L'excès de traceur est éliminé par lavage

La radioactivité liée est proportionnelle à la quantité d'Ag.

<u>Avantages</u>	<u>Inconvénients :</u>
<p>Spécificité : L'utilisation de 2 Ac dirigés contre 2 épitopes différents améliore la reconnaissance spécifique</p> <p>Sensibilité : toute molécule d'Ag mise en présence de l'Ac liant est susceptible d'être captée. Les gammes de concentration sont plus étendues.</p>	<p>Utilisation de quantité d'Ac importantes (méthodes onéreuses) Nécessité pour l'Ag d'avoir 2 épitopes, donc ces méthodes ne sont pas applicables aux haptènes.</p> <p>Possibilité de réactions croisées : Les molécules possédant un épitope semblable à l'un des épitope de l'Ag Présence dans le sérum d'un auto Ac, masquant l'épitope.</p> <p>L'effet crochet (effet cloche) : Peut apparaître pour les concentrations élevées en Ag. Lorsqu'on a un excès d'Ag, celui-ci ne réalise plus de pont entre les 2 Ac, ce qui entraîne une baisse du signal pouvant aller jusqu'à un signal nul. Pour éliminer ce phénomène, plusieurs méthodes sont possibles :</p> <ul style="list-style-type: none">- Addition séquentielle des réactifs séparés par une étape de lavage- Réalisation de 2 dilutions pour chaque échantillon- Diminuer la prise d'essai

c. Protagonistes du dosage:

Le dosage RI nécessite un ensemble d'éléments et de problèmes à résoudre pour une bonne utilisation :

- préparation du substrat marqué
- préparation du réactif R

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

- étalons et courbes d'étalonnage
- techniques de séparation

c.1 préparation du substrat marqué :

2 éléments importants : le marqueur, le substrat et la technique de marquage.

- **Le marqueur :**

Ceci signifie que dans les conditions idéales, le traceur doit se comporter exactement de la même façon que l'Ag non marqué, c'est-à-dire qu'il doit avoir conservé après le marquage, les mêmes propriétés physico chimiques et immunologiques.

Le marqueur doit avoir les caractéristiques suivantes :

- immunoréactivité.
- Pureté radio chimique.
- Activité spécifique élevée.
- Stabilité.
- Autres : détection aisée gamma > bêta, ...

- **Le substrat :**

En immunoanalyse le substrat est un Ag , un haptène ou un Ac.

- **La technique de marquage :**

Où le respect des conditions opératoires est déterminant (marquage, purifications, contrôle de la pureté, stabilité et conditions de conservation).

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

c.2 Préparation du réactif :

Dont dépend la spécificité du dosage, 3 types :

- Ac antistrat
- Protéines spécifiques
- Récepteurs

c.3 Courbes d'étalonnage et étalons :

Le dosage RI est une méthode relative qui consiste à comparer les réponses fournies par les échantillons à doser à celles des solutions étalons.

c.4 Techniques de séparation :

Après incubation, il s'agit de séparer complètement le traceur sous ses deux formes liée et libre avant de mesurer la radioactivité. La méthode doit permettre une séparation complète.

-

<u>Avantages dosage DRI :</u>	<u>Inconvénients :</u>
L'isotope permet un marquage facile et présente un encombrement stérique réduit Le signal est direct , émis par le marqueur lui-même Le signal est spontané, ne faisant pas intervenir une source d'énergie extérieure	Réglementation Précaution et surveillance lors des manipulations Le temps de mesure du signal isotopique, attendre au minimum 1 min Durée de validité des réactifs (on peut ajouter jusqu'à 2 semaines)

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

3. DOSAGE DE LA hTg:

Son dosage présente un intérêt :

- En cancérologie : dans le suivi de l'évolution des carcinomes thyroïdiens différenciés. Après ablation totale de la thyroïde, la thyroglobuline constitue un marqueur précoce et fiable de la survenue des métastases.
- En pathologie thyroïdienne bénigne : le dosage de la thyroglobuline permet de suivre l'évolution de la maladie de Basedow et de guider les sevrages thérapeutiques. Les valeurs de thyroglobuline sont aussi retrouvées augmentées dans les cas de thyroïdites, notamment dans la thyroïdite chronique d'Hashimoto.
- Dans le diagnostic différentiel des kystes thyroïdiens et parathyroïdiens par le dosage simultané de la thyroglobuline et de la parathormone.
- Dans le diagnostic différentiel d'une ectopie et d'une agénésie thyroïdienne : dans l'hypothyroïdie néonatale, la présence de thyroglobuline permet de conclure au diagnostic d'ectopie, alors que, dans l'agénésie, les valeurs de thyroglobuline sont nulles.
- Pour le diagnostic différentiel des thyrotoxicoses : dans la thyrotoxicose induite par l'amiodarone, les taux de thyroglobuline sont élevés. En cas de thyrotoxicose factice, la thyroglobuline est indétectable.

Valeurs établies dans une population de sujets euthyroïdiens indemnes de toute pathologie thyroïdienne n'ayant pas d'anticorps anti-thyroïdiens, non fumeurs, elles vont de 3 à 40 µg/L. La thyroglobuline est plus élevée chez la femme enceinte. La palpation du cou n'entraîne pas d'augmentation de la thyroglobuline ; en revanche la ponction à l'aiguille fine augmente les valeurs de thyroglobuline.

La demie-vie de la thyroglobuline sérique est de 2.7 jours.

La thyroglobuline est habituellement mesurée:

- Le sérum : Prélèvement de sang veineux .
 - Le prélèvement sera réalisé de préférence le matin.
 - Eviter le stress avant le prélèvement.

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

- Signaler d'éventuels traitements en cours.
 - Est recommandé de doser systématiquement les anticorps anti-thyroglobuline (ACT), en parallèle du dosage de thyroglobuline, à l'aide d'une méthode sensible.
-
- Les liquides d'un kyste thyroïdien
 - Les tissus obtenus par cytoponction de nodules thyroïdiens à l'aiguille fine : Au décours de la cytoponction, le rinçage de l'aiguille avec un faible volume d'eau stérile permet de réaliser un dosage de hTg.

Ce dosage a une très grande sensibilité dans le diagnostic de métastase ganglionnaire et complète très utilement l'analyse anatomopathologique parfois non contributive du fait de préparations pauci-cellulaires.

La mesure de la hTg dans le sérum est un défi technique. Actuellement, les méthodes immuno-métriques (IMA) gagnent en popularité sur les méthodes de dosage radio-immunologiques (RIA). C'est parce que les méthodes IMA offrent l'avantage pratique d'un temps d'incubation plus court, une gamme de valeurs mesurées plus étendue et un anticorps marqué réactif plus stable, moins fragile que ceux employés en RIA.

Les laboratoires peuvent maintenant choisir entre des méthodes isotopiques (immuno-radiométrique, IRMAs) et non isotopiques (surtout chimiluminescence, ICMA). Cependant, les méthodes IMA sont plus sujettes à interférence en cas ACT (hTg-Ab) positifs, ce qui conduit à une sous-estimation des niveaux de la hTg sérique. Cela a incité certains laboratoires à choisir des méthodes RIA pour mesurer la hTg sérique chez les malades ayant des ACT positifs et à limiter l'usage de méthodes IMA aux seuls malades sans ACT.

Cependant, aucune méthode ne peut prétendre être totalement libre d'interférences en présence d'ACT qui peuvent provoquer une sur-estimation comme une sous-estimation des valeurs de hTg mesurées.

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

La prévalence de ces anticorps est supérieure chez les patients atteints de carcinome différencié de la thyroïde (CDT) par rapport à la population indemne.

Dans la grande majorité des cas, les anticorps disparaissent dans l'année qui suit le traitement initial. Leur persistance à un titre élevé suggère l'existence d'une maladie résiduelle.

À côté des problèmes créés par les interférences dues aux ACT, les méthodes actuelles de dosage de hTg sont aussi handicapées par des différences dans la standardisation et la spécificité. De plus, elles font généralement preuve d'une sensibilité et d'une reproductibilité insuffisante et manifestent un effet « crochet » en cas de valeurs élevées de hTg.

Du fait de la mauvaise sensibilité fonctionnelle des trousses de dosage de la Tg sérique, la stimulation préalable par la TSH est nécessaire pour améliorer sa sensibilité.

Ces sept dernières années, l'introduction de la TSH recombinante humaine (rhTSH) comme une alternative au sevrage en L-T4 et la démonstration de la faible sensibilité de la scintigraphie diagnostique (4-5 mCi) ont transformé le suivi des patients. Le sevrage en L-T4 reste le gold standard mais indiqué chez les patients à haut risque de maladie résiduelle et/ou de récurrence. Ainsi, pour la plupart des patients, la Tg-stimulée par la rhTSH représente la pierre angulaire du suivi.

4. PROBLEMATIQUE ANALYTIQUE:

Elles peuvent être classées en 5 items :

- Différences de standardisation,
- Sensibilité des techniques,
- Reproductibilité interséries,
- Présence de l'effet crochet,
- Interférence par les auto-anticorps

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

a. Différences de standardisation :

Elle pose à l'heure actuelle encore des problèmes qui peuvent en partie expliquer les différences de résultats notées sur les contrôles.

Les standards utilisés dans les différentes trousse de dosage sont extraits de tissu thyroïdien normal ou pathologique. Selon les procédés de fabrication, on peut s'attendre à une certaine variabilité de composition en iode, en sucres, en aminoacides entre les hTg des standards.

Le standard idéal serait une préparation extraite du sang et non du tissu thyroïdien comme c'est le cas actuellement.

Un standard européen a été développé (CRM 457) ; disponible, il n'est pas encore utilisé dans les trousse de dosage de hTg [10]

Son utilisation pourrait diminuer de 40 à 20 % la variabilité des résultats de hTg d'une trousse à une autre.

Ce standard recommandé ne résoud cependant que partiellement les problèmes.

La forme circulante de la hTg est pratiquement exclusivement la forme dimérique produite par la thyroïde. [11]

Il n'y a pas de molécules de masse différente présente au niveau sanguin : la dispersion des enquêtes interlaboratoires pourraient être dues à des différences de motifs antigéniques reconnus sur la hTg.

Il existe une immuno-réactivité différente entre la hTg tissulaire et la hTg sanguine. Ces différences d'immunoréactivité seraient la conséquence du processus de sécrétion de la hTg circulante. [11]

Dans le cas d'une thyroïde normale ou stimulée (maladie de Basedow), la thyroglobuline fortement iodée située dans l'espace folliculaire clos réintègre le milieu intracellulaire afin de libérer les hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine par 2 mécanismes décrits : la macropinocytose et la micropinocytose.

Il existe un transport apico-basolatéral de hTg ou transcytose de petites quantités variables de hTg qui explique la présence physiologique de hTg dans le sérum.

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Dans le cas de la thyroïdite subaiguë, après rupture de certains follicules, il y a apparition de hTg dans la circulation directement sans passer par la cellule. Cette hTg est identique à la hTg de la thyroïde.

Dans le cas d'une perturbation de l'organisation cellulaire (cancer), la sécrétion de hTg est directe, sans stockage. Les molécules de hTg sont peu ou pas iodées.

Dans le cas du cancer, il existe une hétérogénéité en iode et en résidus glycosylés qui ont des effets sur la conformation de la molécule.

Les anticorps du dosage sont dirigés contre des épitopes conformationnels. Ceci peut expliquer que cette hétérogénéité produise des réponses différentes suivant les anticorps employés.

Ce paramètre a une importance capitale pour :

- mieux déceler les résidus thyroïdiens post thyroïdectomie totale,
- déceler le plus précocement les résidus de cancer thyroïdien même pour des patients sous freinage thyroïdote,
- déceler lors de l'administration de TSH recombinante une augmentation de hTg, signe de résidu ou de récurrence.

b. Sensibilité des techniques :

La limite de détection analytique indiquée par les fournisseurs de trousse n'est pas utilisable pour le suivi des patients.

Il faut utiliser la limite de détection fonctionnelle définie comme étant la plus faible concentration pouvant être mesurée de façon répétitive en reproductibilité inter-essais avec un coefficient de variation de 20 %. Elle doit être définie pour chaque trousse et étudiée sur une durée suffisamment longue : 13 séries minimum espacées sur 6 à 12 mois. [12]

Le problème étant que les valeurs de cette limite de détection fonctionnelle ne sont pas comparables d'une trousse à une autre si le standard de référence n'est pas le même.

Pour la trousse de dosage actuelle Schering Cis Biointernational, [13] la limite de détection fonctionnelle déterminée avec les critères de C. Spencer est de $1\mu\text{g/L}$ [14].

>Importances des intra et inter-essais :

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Les précisions intra- et inter-essais exprimées en pourcentage de coefficient de variation (% CV) sont des paramètres importants pour valider la performance d'une méthode mesurant la h T g .

La précision intra-essai pour les méthodes utilisant un immuno-essai, est meilleure que celle inter-essai. Ceci est dû au fait que les mesures faites dans une seule série ne sont pas soumises à la variabilité introduite en utilisant des lots de réactifs et de gammes d'étalonnage différents.

La précision intra-série pourrait être le paramètre le plus pertinent pour évaluer la réponse de la hTg sérique à la stimulation par rhTSH . [15]

c. Reproductibilité inter-séries :

Lorsqu'on utilise la mesure de la hTg pour une surveillance régulière, plus l'intervalle entre les différents dosages successifs est important, plus la variabilité sera grande et pire sera la précision inter-séries.

Les matrices non humaines utilisées pour déterminer des valeurs mesurées faibles peuvent produire des limites de sensibilité irréalistes, comparées avec les dosages effectués avec un sérum humain dépourvu d'ACT. Il est important d'établir la sensibilité et la précision interessais de prélèvements qui couvrent une période de 6 à 12 mois utilisé pour suivre des malades avec CTD.

L'objectif proposé pour l'imprécision maximale des mesures de hTg sérique pour surveiller les malades devrait être $< 5\%$.Il est improbable que les méthodes de mesure actuelles de la hTg puissent obtenir une telle précision sur la période habituelle de 6 à 12 mois.

Ce problème de la précision peut être résolu en mesurant des échantillons du malade, conservés congelés dans la même série de dosages que le spécimen actuel.

Le dosage de hTg lors du suivi des cancers thyroïdiens différenciés est généralement annuel ce qui justifie une bonne reproductibilité d'une année sur l'autre. Une mauvaise reproductibilité pourrait différer la détection de rechute de progression de la maladie. [15]

d. Présence de l'effet crochet :

Ce phénomène existe comme dans beaucoup de techniques immunométriques sandwich

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
lorsque les domaines de concentration sont très importants.

L'effet crochet abaisse faussement le résultat des dosages.

Dans certaines techniques en 1 étape, l'effet crochet existe à partir de 300 µg/L.

Comment y remédier ?

- soit faire une dilution systématique lors du dosage, ce qui augmente significativement le coût du dosage.

- soit utiliser une technique en 2 étapes (avec incubation séquentielle des réactifs et lavage) qui affranchit alors ce phénomène.

La fréquence des résultats de thyroglobuline très élevés est rare (de l'ordre de 3 à 4 % pour des valeurs supérieures à 500 µg/L). [15]

e. Interférences par les auto-anticorps :

Ce problème d'interférence dans les dosages de thyroglobuline est majeur, et non résolu à l'heure actuelle.

La prévalence des auto-anticorps antithyroglobuline est variable selon les études : de 15 à 45 %, en particulier chez des patients atteints de cancers différenciés de la thyroïde. Cette variabilité dépend des méthodes de détection. La variabilité d'affinité, la quantité d'anticorps, la durée nécessaire pour que l'équilibre réactionnel antigène-anticorps soit atteint font que chaque méthodologie détecte une certaine catégorie de molécules.

Techniquement, les auto-anticorps interfèrent dans les méthodes sandwich soit en empêchant la thyroglobuline de se fixer aux anticorps de la phase solide, soit en inhibant la liaison du deuxième anticorps : l'anticorps marqué.

Pour détecter le sens et l'importance de cette interaction, il est nécessaire de doser les anticorps anti-thyroglobuline par une méthode suffisamment sensible (les méthodes par hémagglutination sont à proscrire) systématiquement lors du dosage de la thyroglobuline. [15]

Quelques solutions proposées :

- EVALUATION QUANTITATIVE DE L'ARN_m DE LA THYROGLOBULINE

Cette évaluation par RT-PCR (reverse transcriptase PCR) a été proposée pour pallier les

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
interférences de dosage de la hTg et la mauvaise sensibilité des trousses.

Sa faisabilité repose sur la présence de cellules circulantes.

Les résultats sont très variables selon les études du fait de la variabilité des ARNm amplifiés définie par les couples de primers utilisés.

La fiabilité de cette approche est encore insuffisante.

- COMPARAISON Tg-rh TSH ET Tg-hypo

L'administration de rhTSH sous sa forme actuelle (2 injections IM de 0,9mg à J1 et J2) entraîne un pic de TSH à J3 et un pic de Tg (en règle générale) à J5.

Ceci tient à la courte période de stimulation générée par la rhTSH. Pour les patients avec une Tg résiduelle élevée (>5 ng/ml) et notamment les patients avec métastases, cette différence n'a pas de répercussion pour classer les patients en Tg+et Tg-. Pour les autres patients avec Tg plus basse, ceci n'est pas démontré, mais il est possible que certains d'entre eux puissent échapper au dépistage par la rhTSH. De plus, des tumeurs faiblement différenciées s'accompagnent d'une augmentation moindre (< 3 fois) lors de la réponse de la hTg sérique à la stimulation par TSH .

UTILISATION EN CLINIQUE:

Le dosage sérique de la hTg n'a pas de place dans le diagnostic positif de CDT sauf dans le cas d'une métastase osseuse révélatrice dont l'origine thyroïdienne est évoquée et qui s'associe ordinairement à des taux de hTg très élevés (>500 ng/mL).

La hTg-stimulée est très souvent inférieure à 5 ng/mL après une thyroïdectomie totale. Des disparités peuvent exister entre les équipes chirurgicales, mais les taux sont très rarement supérieurs à 30 ng/mL. Le taux de hTg est souvent un peu plus élevé en cas de thyroïdectomie en 2 temps car le geste initial a souvent été moins complet. L'intérêt de ce paramètre a été peu étudié jusqu'à présent malgré son utilité au quotidien reconnue par nombreux cliniciens en charge de ces patients.

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Une hTg sérique mesurée pendant la stimulation de la TSH (TSH endogène ou TSH recombinante humaine, rhTSH) est plus sensible pour détecter un cancer thyroïdien différencié (CTD) résiduel ou métastatique qu'une mesure basale de la Tg faite pendant le traitement par L-T4.

Il est réalisé classiquement entre 6 et 12 mois.

L'utilisation de la rhTSH diminue les inconforts du suivi en évitant l'hypothyroïdie, ce qui pourrait aussi avoir un impact sur le coût en réduisant les arrêts de travail prolongés.

La scintigraphie a été abandonnée du fait de sa faible sensibilité.

Toutefois, le sevrage en L-T4 reste souvent indiqué chez les patients à haut risque de maladie résiduelle.

Les auteurs insistent sur la nécessité de combiner l'échographie de façon systématique à ce contrôle.

Par ailleurs, la suite de la prise en charge des patients est basée sur les résultats de ce premier contrôle dont la qualité doit être optimale

L'intérêt de renouveler les dosages de hTg sous stimulation n'est pas démontré chez les patients sans maladie résiduelle à 1 an,

Le risque de récurrence se situe autour de 1 à 3% à 10 ans.

Un dosage de hTg sous freination combiné à un examen clinique et éventuellement une échographie cervicale semblent suffisants pour les patients de meilleur pronostic.

Patients avec hTg résiduelle sans maladie identifiable, Il n'existe pas actuellement de consensus sur le seuil de hTg justifiant une intervention thérapeutique. Il a été montré que la hTg pouvait décroître avec le temps sans administration complémentaire d'I131.

>Chez ces patients hTg+ sans maladie identifiable: l'exploration épisodique par rhTSH pourrait être utile pour apprécier la cinétique de hTg.

Patients avec maladie résiduelle: au décours du traitement (chirurgie et/ou I131), le suivi de la hTg permet de valider l'efficacité du traitement. Ceci est vrai pour les lésions différenciées qui sécrètent de la hTg mais reste à vérifier pour les sites moins différenciés, notamment ceux identifiés par la TEP au 18FDG.

>Tg dans les jours qui suivent une irathérapie:

L'élévation de la hTg est la conséquence des effets aigus de l'I131 sur les cellules d'origine

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
thyroïdienne. Ceci implique la captation de l'I131 et donc la persistance de l'expression du transporteur de l'iodure (Natrium Iodide Symporter NIS) à la surface des cellules.
Compte tenu de l'extrême variation de cinétique et d'amplitude observée entre les patients, cette élévation ne peut prédire la réponse au traitement. Par contre, ce paramètre pourrait s'avérer utile pour décider de traiter à nouveau par l'I131 des patients avec une hTg résiduelle mais sans lésion visible sur les contrôles scintigraphiques post-thérapeutiques.

PARTIE PRATIQUE

1. INTRODUCTION/PROBLEMATIQUE :

Les cancers de la glande thyroïde sont rares (1% environ de l'ensemble des cancers). Il existe différents types de cancer : les cancers différenciés de souche folliculaire [papillaires (80% des cas) ou vésiculaires (15%)], les carcinomes médullaires développés à partir des cellules C et les carcinomes peu ou indifférenciés (anaplasiques).

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

La surveillance et le suivi des patients atteints de cancer thyroïdien différencié opéré se fait sur le plan biologique par le dosage sérique et ganglionnaire de la thyroglobuline, sa permanence ou sa réapparition signe la récurrence ou la métastase. Il est essentiel que la surveillance biologique des patients se fasse dans le même laboratoire.

Habituellement le dosage sérique de la thyroglobuline se fait par méthode immunométrique à 02 sites (sandwich), notamment les méthodes immunoradiométriques (IRMA) en ce qui concerne cette étude qui a été réalisé au niveau du service de médecine nucléaire du CHU Tlemcen.

Les dosages doivent être standardisés sur le standard européen CRM 457 et d'une sensibilité fonctionnelle inférieure à 1ng/ml. De même, la recherche systématique d'interférences par dosage d'anticorps anti-thyroglobuline est nécessaire puisqu'il existe une corrélation directe entre les taux d'anticorps et la thyroglobuline.

Dans ce contexte, nous avons voulu comparer la performance analytique de deux trousse de dosages radioimmunométriques pour le dosage de la thyroglobuline chez les patients atteints de carcinome différencié de la thyroïde suivis au niveau du service de médecine nucléaire du CHU Tlemcen.

2. OBJECTIF DE L'ETUDE :

Comparer la performance analytique de deux trousse de dosages radioimmunométriques pour le dosage de la thyroglobuline du fabricant Beckman coulter IRMA avec celle de Cisbio International IRMA prise comme « gold standard ».

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

3. MATERIELS ET METHODES :

Le dosage de la thyroglobuline a été réalisé au niveau du laboratoire du service de médecine nucléaire du CHU Tlemcen sur 99 sérums de patients suivis pour carcinome différencié de la thyroïde au niveau du même service. Les deux méthodes de dosages employés utilisent le même principe de dosage radio-immunométrique avec deux trousse provenant de deux fabricants différents.

Tous les dosages ont été réalisés au niveau du laboratoire du service de médecine nucléaire du CHU Tlemcen.

Les prélèvements ont été effectués sur des tubes de type EDTA.

Le dosage a été effectué sur des sérums préalablement congelés à -20°C.

Sur le même sérum, réparti en plusieurs aliquotes, ont été dosées séparément :

La hTg avec la trousse Cisbio International IRMA.

La hTg avec la trousse Beckman Coulter IRMA.

La recherche systématique des ACT a été faite avec une trousse de Beckman coulter IRMA.

Un seuil >30mU/l à été considéré comme positif.

Les sérums contrôles des deux trousse ont été utilisés respectivement dans les deux séries de dosages.

Le dosage était manuel.

La mesure de la radioactivité de la fraction liée a été réalisée en calculant le pourcentage de liaison B/T (%) en fonction de la concentration.

La lecture s'est faite sur un compteur gamma de type Perkin-Elmer à 05 détecteurs.

Les principales caractéristiques des 02 trousse de dosage sont les suivantes :

(Word to PDF - Pas enregistré) http://www.word-to-pdf.abdio.com/

CARACTERISTIQUES	IRMA Fabricant CIS-BIO International	IRMA Fabricant Beckman Coulter
Principe	Sandwich	Sandwich
Ac monoclonaux	Tube revêtu de 4 Ac 1 Ac radiomarqué I ₁₂₅	Tube revêtu de 3 Ac 1 Ac radiomarqué I ₁₂₅
Nombre de standards	7 standards [0,2 – 110]ng/mL	1 blanc + 7 standards [0 – 600] ng/mL
Contrôles	2	1
Temps d'incubation	1 ^{ère} incubation 3H 2 ^{ème} incubation 16-20H	1 ^{ère} incubation 2H 2 ^{ème} incubation 18-24H
Détection	Compteur gamma calibré par l'iode 125	Compteur gamma calibré par l'iode 125
Sensibilité analytique	0.2 ng/mL	0.3 ng/mL
Sensibilité fonctionnelle	0.7 ng/mL	Non définie

ETUDE STATISTIQUE :

Sachant que la trousse Cisbio International IRMA est la référence ou la gold standard dans le laboratoire de MNT, les résultats obtenus font l'objet d'une analyse statistique par logiciel SPSS version 20 avec le test Epi info.

de façon à comparer les performances analytiques des deux trousse citées.

Etude du caractère quantitatif :

La valeur d'une méthode de diagnostic est toujours relative à une méthode de référence.

Dans le cas où le test donne des résultats sous forme d'un caractère quantitatif, on choisit un seuil a priori qui permettra de partager la distribution en normal et anormal. Dans ce cas, on trace une courbe dénommée : la courbe R.O.C (Receiver Operating Characteristic Curve).

Selon cette méthode, on met en relation la sensibilité (proportion de vrais positifs) et la

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
spécificité (proportion de faux positifs)du test .

Les variables test sont :

- l'aire sous la courbe qui définit la zone où le test est significatif.
- le test asymptotique qui permet de dire que le test est performant s'il est inférieur à 0.001.
- l'intervalle de confiance.
- l'erreur standard.

Etude du caractère qualitatif :

L'évaluation de la méthode diagnostique est réalisée par une validité interne (qualités de la méthode), définie par l'aptitude à identifier la maladie. La validité « proprement dite » est la performance du test par rapport à une méthode de référence (sensibilité,spécificité,valeurs prédictives sont les plus connues).

SEUIL 0.7ng/mL :

Il correspond à la sensibilité fonctionnelle de notre trousse de référence Cisbio International IRMA,pour le dosage de la hTg.

Nous avons considéré que les ACT sont significatifs à partir de 30ng/mL selon le fabricant de la trousse Beckman coulter international IRMA.

4. RESULTATS

Les résultats obtenus sont :

Pour les sérums contrôles :

Tg Cisbio : 1^{er} niveau de contrôle : valeur pratique :12.33 [13.9+/-1.95ng/ml]

2eme niveau de contrôle : valeur pratique : 45,18 [45 +/- 6,8 ng/ml]

Tg Beckman : valeur pratique :25.03ng/ml [24.8+/-5.4ng/ml]

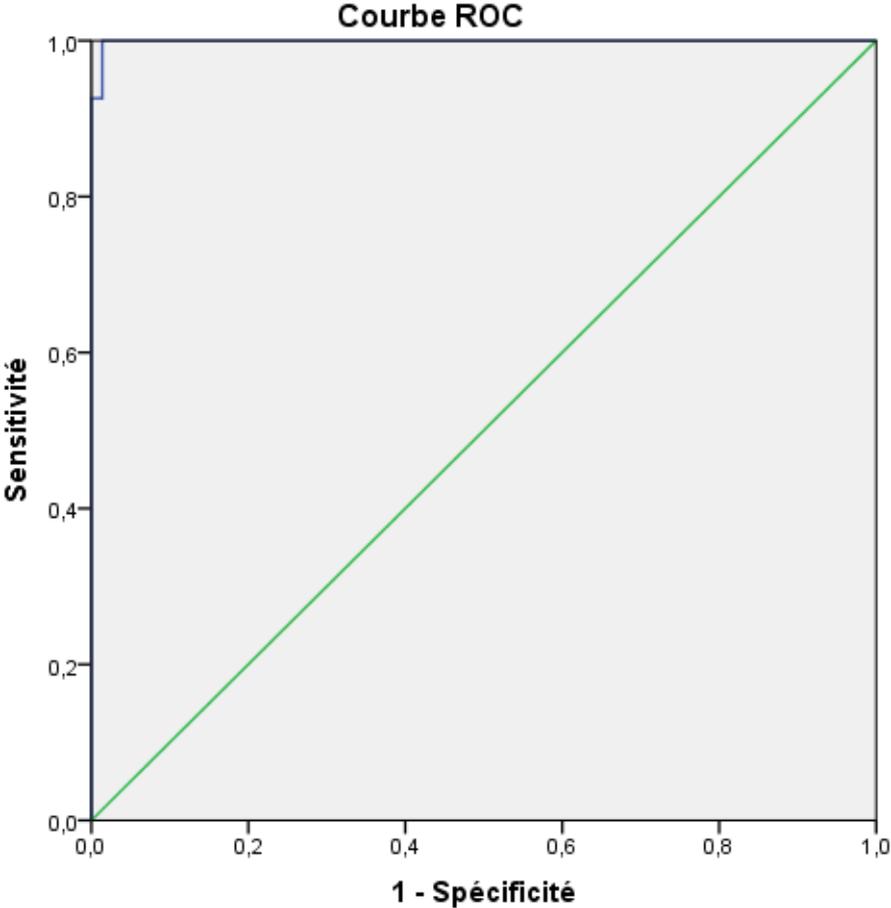
(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Pour un seuil de 0.7 ng/mL :

**Récapitulatif du
traitement des
observations**

Seuil_0.7	N valide (incomplet)
Positif	27
Négatif	72

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>



(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Variable(s) de résultats tests: Beckman Coulter IRMA

Zone	Erreur Std.	Signif. asymptotique	Intervalle de confiance 95% asymptotique	
			Borne inférieure	Borne supérieure
	,999	,001	,000	,996 1,000

Test Cis-BIO international IRMA (Gold Test)

		M +	M –	Total
Méthode Beckman Coulter	S +	VP 27	FP 5	VP+FP 32
	S –	FN 0	VN 67	FN+VN 67
	Total	VP+FN 27	FP+VN 72	99

- VP :** résultat vraiment positif (résultat positif chez les sujets malades)
- FP :** résultat faussement positif (résultat positif chez les sujets sains)
- FN :** résultat faussement négatif (résultat négatif chez les sujets malades)
- VN :** résultat vraiment négatif (résultat négatif chez les sujets sains)

Sensibilité :

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

Sensibilité : $Se = VP / (VP + FN) \times 100$ $Se = 100 \%$ IC à 95 % [83.4-100]

La sensibilité est le pourcentage de vrais malades que le test peut détecter.

Spécificité :

Spécificité : $Sp = VN / (VN + FP) \times 100$ $Sp = 93 \%$ IC à 95 % [83.9-97.4]

La spécificité est le pourcentage des sujets sains que le test peut détecter.

Pourcentage de faux positifs : $1 - Sp = 7\%$

Valeur prédictive du résultat positif :

Valeur prédictive du résultat positif : $VPP = VP / (VP + FP) \times 100$

$VPP = 83.3 \%$ IC à 95 % [64.5-93.7]

La valeur prédictive du résultat positif indique la probabilité d'avoir la maladie quand le test est positif.

Valeur prédictive du résultat négatif :

Valeur prédictive du résultat négatif : $VPN = VN / (VN + FN) \times 100$

$VPN = 100 \%$ IC à 95 % [93.2-100]

La valeur prédictive du résultat négatif indique la probabilité de ne pas avoir la maladie quand le test est négatif.

Valeur globale (efficience) du test Beckman Coulter:

Valeur globale du test = $(VP + VN) / (n) \times 100 = 94 / 99 = 94.9 \%$

La valeur globale ou proportion de sujets bien classés est la proportion des résultats valables dans l'ensemble de toutes les épreuves effectuées.

Le pourcentage de faux positifs :

$1 - Sp = 7 \%$

5. DISCUSSION/CONCLUSION

La thyroglobuline est un marqueur des cancers différenciés de la thyroïde.

Après thyroïdectomie totale et sous traitement freinateur par la L thyroxine, la présence d'un taux décelable de thyroglobuline signe la présence d'un reliquat de tissu thyroïdien, sain ou cancéreux.

Le suivi biologique de la hTg effectué au niveau du laboratoire du service de médecine nucléaire du CHU Tlemcen se fait habituellement par la trousse Cis bio international IRMA considéré comme « Gold standard ». Sa performance analytique a été comparée avec la trousse Beckman coulter IRMA .

Notre étude a porté sur un échantillon de 99 sérums déjà dosés sur la trousse de Cisbio international IRMA et redosés sur la trousse de Beckman Coulter IRMA . Notre objectif était de savoir si cette dernière pourrait être une alternative à Cis bio international IRMA au seuil de 0,7 ng/ml qui représente la sensibilité fonctionnelle de notre trousse de référence.

L'analyse des données est effectuée par une étude statistique:

La valeur d'une méthode de diagnostic est toujours relative à une méthode de référence. Sa qualité n'est pas fixe ; elle est fonction de la prévalence de la maladie dans la population et de la composition de la méthode diagnostique qui peut être basée sur un ou plusieurs tests.

. La méthode doit avoir fait preuve de :

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

- Son efficacité : qui se définit par la fréquence de sa confirmation par un moyen de diagnostic acceptable. Elle est évaluée par la mesure dans laquelle l'épreuve permet de distinguer les sujets atteints de la maladie de ceux qui en sont exempts. (Caractères quantitatifs et qualitatifs : seuil, courbe ROC, spécificité, sensibilité, valeurs prédictives).

. Acceptabilité de la méthode :

Un test est généralement acceptable lorsque la sensibilité et la spécificité sont supérieures à 80 %.

Un test très sensible est préféré : lorsque la maladie est grave et ne peut être ignorée, et lorsqu'elle est traitable.

Un test très spécifique est préféré : lorsque la maladie est grave et incurable, et si les conséquences de se savoir sain sont graves.

Une Valeur Prédictive Positive (VPP) élevée est préférée : là où le traitement des sujets faussement positifs aurait des conséquences graves (exemple de radiothérapie).

Au seuil de 0.7 ng/mL, la trousse Beckman coulter IRMA a les propriétés suivantes :

Aire sous la courbe de 99.9% donc le test est significatif dans la majorité des cas.

Test asymptotique = 0.000, il est inférieur à 0.001 donc, le test est performant.

Sensibilité = 100% donc la trousse peut détecter 100% des vrais malades.

Spécificité = 93% équivaut à dire que les faux positifs ou les sujets sains sont de l'ordre de 7%.

La valeur diagnostique d'un examen est d'autant meilleure qu'il est à la fois sensible et

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>
spécifique.

VPP ou valeur prédictive positive=83.3%.

VPN ou valeur prédictive négative=100%.

Un test est d'autant plus intéressant que ses valeurs prédictives positive et négative sont élevées.

Au seuil de 0.7ng/mL, la trousse Beckman coulter IRMA s'avère sensible ,spécifique et peut rivaliser avec la trousse de référence Cis Bio international IRMA.

Pour mieux cerner la trousse test Beckman coulter IRMA, nous l'avons testée à des seuils différents, toujours avec la même méthode statistique.

Résultats aux différents seuils :

SEUIL	AIRE SOUS LA COURBE	ASYMPTOTE	ERREUR STANDARD
0.2ng/mL	56%	0.503	0.057
0.3	83.9%	0.000	0.048
0.4	99.3%	0.000	0.006
0.5	100%	0.000	0.000
0.6	99.8%	0.000	0.002
0.7	99.9%	0.000	0.001
1	99.9%	0.000	0.001

Ainsi, on remarque que :

- Aux seuils de 0.2 et 0.3 ng /mL , la sensibilité et la spécificité de Cis bio international IRMA est meilleure que Beckman coulter IRMA.

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

- Pour des seuils compris entre 0.4 et 1 ng/mL, la trousse Beckman coulter est sensible et spécifique. Elle s'avère être une bonne alternative.

Il convient de préciser quelques points :

Nous avons utilisé des valeurs de dosages déjà effectués, l'échantillonnage dans notre travail n'a pas été fait au hasard, cependant la courbe ROC est valable même si l'échantillonnage n'est pas représentatif.

Concernant la positivité des ACT, il n'existe pas de différence significative selon la spécificité et la sensibilité des deux méthodes.

Au vu de ces résultats, il est important de s'intéresser au coût de chaque trousse et utiliser ultérieurement le kit ayant le meilleur rapport qualité/prix.

Les limites de notre étude portent sur le fait que Cis bio international IRMA soit prise comme référence puisque c'est la trousse utilisée habituellement pour le dosage de la hTg dans le laboratoire du service de médecine nucléaire du CHU de Tlemcen.

Dans le cadre de travaux ultérieurs, il serait plus judicieux de faire une étude comparative avec une 3ème trousse pour une meilleure interprétation du travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Registre des cancers de Tlemcen. Rapport 2006-2010. Professeur K. Meguenni.

[2] Physiologie de la glande thyroïde année 2006-2007
J. Leclère, J Orgiazzi, B Rousset, JL Schienger, JL Wemeau. Expansion
Scientifique Française, 2e édition 2001.

[3] Dr Serge Nataf, Lyon LA GLANDE THYROÏDE

[4] Rapport du contrôle de marche des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage
de thyroglobuline
(Version du 03/03/2009)

[5] Cancers de la thyroïde Docteur Olivier CHABRE Avril 2003

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

[6] Le cancer de la thyroïde :2010 Livret préparé par le professeur Martin Schlumberger, chef du Service de Médecine Nucléaire à l'Institut Gustave Roussy

[7] Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. Histological typing of thyroid tumours. Second Edition
World Health Organization. International Histological Classification of Tumours. Berlin: Springer-Verlag; 1988.

[8] Schlumberger MJ, Filetti S, Hay ID. Non toxic goiter and thyroid neoplasia. In: Larsen RP, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. Williams' Textbook of Endocrinology. 10th edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 2003. p. 457–90.
Annales d'Endocrinologie 2007, 68 : 120-128

[9] Malthiéry Y., Savagner F. La thyroglobuline: la prohormone thyroïdienne. Dans La Thyroïde, Paris, Elsevier, 2001 .22

[10] Feldt-Rasmussen U., Profilis C., Colinet E., Schlumberger M., Black E., Purification and assessment of stability and homogeneity of human thyroglobulin reference material (CRM 457). *Exp Clin Endocrinol* 1994 ; 102 : 87-91

[11] Druetta L., Bornet H., Sassolas G., Rousset B. Analyse critique du dosage de la thyroglobuline. *Immunol Biol Spéc* 1998 ; 13 : 201-207

[12] Spencer C., Takeuchi M., Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin. Chem.*, 1996 ; 42 : 164-173.

[13] Marquet P.Y., Daver A., Sapin R., Bridgi B, Mratet JP, Hartmann d., Paolucci F., Pau B. Highly sensitive immunoradiometric assay for serum thyroglobulin with minimal interference from autoantibodies. *Clin. Chem.* 1996, 42, 258-262.

[14] Flori P. Analyse critique de 2 techniques différentes de dosage de la thyroglobuline sérique : RIA (Mr Bornet-Lyon) et IRMA (Sanofi-Pasteur) Evaluation et signification au cours du suivi de cancers thyroïdiens différenciés. Thèse Lyon 1998.

(Word to PDF - Pas enregistré) <http://www.word-to-pdf.abdio.com/>

[15] Anne Charrié Le point actuel sur la thyroglobuline. Laboratoire de Techniques Nucléaires et Biophysiques Centre Hospitalier Lyon Sud - Pierre-Bénite Imagerie fonctionnelle et métabolique - 2003 - vol.27 - n°4

[16] "Principes de Biochimie" Horton et al. (1994) - De Boeck Université - ISBN : 2-8041-1578-X

[17] Tavernier B.,Lebuffé G. Crise aigue thyrotoxique. Pourriat JL. Martin EDs C. Les principes de réanimation chirurgicale. Arnette 2^{nde} édition 2005 , Pp1257-60

[18] Cooper DS N. Antithyroid drugs. Engl J med. 2005 Mar 3 ;352 (9):905-17

[19] Ashikaga H. Propanolol administration in a Manthous C.A. Thyroid strom presenting as multiple organ dysfunction syndrome. Chest, 2000; 118: 877-879