

TABLE DES MATIERES

<i>Table des matières</i>	9
<i>Table des illustrations</i>	11
<i>Liste des abréviations</i>	13
INTRODUCTION	15
1. Les perturbateurs endocriniens	16
2. Les insecticides : un exemple de perturbateur de la fonction thyroïdienne ..	16
3. Les lacunes des études réglementaires	17
4. Les objectifs du programme de recherche sur l'étude de l'impact du fipronil sur la fonction thyroïdienne	17
CHAPITRE 1 : la fonction thyroïdienne	19
1. L'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien	20
1.1. La glande thyroïde	20
1.2. Les hormones thyroïdiennes	21
1.3. La synthèse des hormones thyroïdiennes.....	22
1.4. Le catabolisme et l'élimination des hormones thyroïdiennes.....	23
1.5. Les effets des hormones thyroïdiennes	23
1.6. La régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes par l'axe hypothalamo-hypophysaire	25
2. Le transport plasmatique des hormones thyroïdiennes.....	27
2.1. Les protéines de transport	27
2.1.1. La Thyroxine-Binding Globulin (TBG).....	28
2.1.2. La Transthyréline ou Thyroxine Binding Prealbumin (TTR ou TBPA)	28
2.1.3. L'Albumine (Alb)	29
2.1.4. Les variations interspécifiques	30
2.2. Les paramètres de liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques...31	
2.3. Manipulations pharmacologiques de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques	33
2.4. Fraction libre et concentration en hormone libre : les bases de la confusion	35
2.4.1. Dans les conditions <i>in vitro</i>	36
2.4.2. Dans les conditions <i>in vivo</i>	37

CHAPITRE 2 : Réalisations expérimentales..... 41

1. Identification d'un inhibiteur compétitif	43
1.1. Matériels et méthodes	45
1.1.1. Méthodes analytiques.....	45
1.1.2. Protocole expérimental.....	45
1.1.2.1. Premier essai pilote : brebis non thyroïdectomisées	45
1.1.2.2. Deuxième essai pilote : brebis thyroïdectomisées	46
1.2. Résultats.....	47
1.2.1. Effets des inhibiteurs chez les brebis non thyroïdectomisées.....	47
1.2.2. Effets de la phénylbutazone chez les brebis thyroïdectomisées	49
1.3. Discussion.....	50
2. Approche <i>in vitro</i> : évaluation de la capacité de la phénylbutazone à déplacer les hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines plasmatique.....	53
2.1. Protocole expérimental	53
2.2. Procédure expérimentale.....	54
2.2.1. Prélèvements sanguins et traitement des plasmas	54
2.2.2. Préparations des solutions plasmatiques de T3 avec ou sans phénylbutazone	54
2.2.3. Dialyse à l'équilibre	55
2.2.3.1. Procédure de dialyse à l'équilibre.....	55
2.2.3.2. Traitement des solutions de plasma et de tampon dialysés.....	56
2.2.3.3. Analyse des données.....	58
2.3. Résultats.....	59
2.4. Discussion.....	61
3. Approche <i>in vivo</i> : effet de l'administration phénylbutazone à des brebis thyroïdectomisées et supplémentées en hormones thyroïdiennes sur les concentrations hormonales plasmatiques.....	63
3.1. Matériels et méthodes	63
3.1.1. Animaux.....	63
3.1.2. Protocole expérimental.....	63
3.1.2.1. Profil nyctéméral des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes	63
3.1.2.2. Profil de décroissance des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes après la thyroïdectomie.....	64
3.1.2.3. Etude de compétition <i>in vivo</i>	64
3.1.3. Procédure expérimentale	65
3.1.3.1. Thyroïdectomie.....	65
3.1.3.2. Prélèvements sanguins, traitement des échantillons	66
3.1.3.3. Supplémentation et administration	66
3.1.3.4. Méthodes analytiques	67
3.1.3.5. Détermination de la clairance et du taux de production des hormones thyroïdiennes	67
3.1.3.6. Analyses statistiques des données.....	68
3.2. Résultats.....	68
3.2.1. Profil nyctéméral des concentrations en hormones thyroïdiennes	68
3.2.2. Clairance et taux de production des hormones thyroïdiennes	69
3.2.3. Profil de décroissance des concentrations en hormones thyroïdiennes après la thyroïdectomie.....	70
3.2.4. Etude de compétition <i>in vivo</i>	71

DISCUSSION 75

Références bibliographiques..... 81

Table des illustrations

Index des figures

Figure 1 : Coupe histologique du parenchyme de la thyroïde.	21
Figure 2 : Les hormones thyroïdiennes T3 et T4.....	21
Figure 3 : Axe Hypothalamo-Hypophysio-Thyroïdien de régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	26
Figure 4 : Evolution des concentrations en hormones thyroïdiennes liées à la TBG (<i>B</i>) en fonction de la concentration en hormones thyroïdiennes libres (<i>F</i>).	32
Figure 5 : Variations prédites selon Toutain et Bousquet-Melou ⁽⁶⁹⁾ des concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres dans les conditions <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> à la suite de l'ajout d'un inhibiteur compétitif de la liaison des HT aux protéines plasmatiques..	39
Figure 6 : Protocole expérimental de l'essai pilote n°1. PS = Prélèvement sanguin.....	46
Figure 7 : Protocole expérimental de l'essai pilote n°2. PS = Prélèvement sanguin.....	47
Figure 8 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes T4 et T3 libres (symbole rond ouvert) et totales (symbole carré plein) des 3 brebis qui ont reçu respectivement une administration intraveineuse de furosémide (A), de phénylbutazone (B) ou d'acide méclofénamique (C). L'aire ombrée représente la période qui suit l'administration.	48
Figure 9 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en T4 libre (symbole losange ouvert), T3 totale (symbole carré plein) et T3 libre (symbole triangle ouvert) à la suite d'une administration intraveineuse du solvant de l'acide méclofénamique. L'aire ombrée représente la période qui suit l'administration.....	49
Figure 10 : Effet de l'administration IV de la phénylbutazone (<i>Phénylarthrite</i> ND 20 mg/kg) sur les concentrations plasmatiques (moyenne + écart type) de T4 (A) et de T3 (B) totales et libres de deux brebis thyroïdectomisées supplémentées en T4 à la dose de 3 µg/kg/j par voie sous cutanée. L'aire ombrée représente la période qui suit l'administration de phénylbutazone.....	50
Figure 11 : Effet de l'addition de phénylbutazone dans le plasma de brebis surchargé en T3 à la concentration totale de 5 ng/mL sur le pourcentage de T3 libre évalué par dialyse à l'équilibre.....	59
Figure 12 : Evolution des concentrations plasmatiques en T3 liée aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations en T3 libre en l'absence (symboles ouverts) et en présence de phénylbutazone à la concentration de 500 µg/mL (symboles fermés).....	61
Figure 13 : Protocole expérimental de l'étude de l'effet de la phénylbutazone sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes.....	65
Figure 14 : Evolution au cours du nycthémères des concentrations plasmatiques moyennes (± écart-type) de T3 totale (TT3), T4 totale (TT4) (graphique A) et de T3 libre (FT3) et T4 libre (FT4) (graphique B) (n=6 brebis). Les prélèvements ont été effectués toutes les 2 h pendant 24 heures.	69
Figure 15 : Cinétique temporelle de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes ± écart-type (n=6 brebis) de T3 (A) et T4 (B) totales et libres après thyroïdectomie. ...	70

- Figure 16 : Effet de l'administration intraveineuse de phénylbutazone (20 mg/kg) sur les concentrations plasmatiques totales et libres de T3 (A) chez les brebis THX supplémentées en T3 et sur les concentrations plasmatiques totales et libres de T4 (B) chez les brebis THX supplémentées en T4, (moyenne + écart type) (n=6 brebis). La première ligne verticale pointillée correspond à l'administration de l'excipient. La zone grisée correspond à la période qui suit l'administration de phénylbutazone au temps 0, schématisée par la deuxième ligne pointillée verticale..... 72
- Figure 17 : Valeurs moyennes globales \pm écart-type (n=6 brebis) de des concentrations plasmatiques en T3 et T4 totales et libres, 4h avant, 1h après et 6h après l'administration de phénylbutazone (*=p<0.05 ; **=p<0.005). PB=Phénylbutazone..... 73

Index des tableaux

Tableau 1 : Propriétés des protéines de liaison des hormones thyroïdiennes (TBG, TTR et Albumine) chez l'homme ⁽²⁾ , les ovins et le rat ⁽⁶⁶⁾	30
Tableau 2 : Pourcentage de T4 liée aux protéines plasmatiques chez différentes espèces ⁽²⁰⁾	30
Tableau 3 : Substances ayant un effet sur le transport des hormones thyroïdiennes.....	34
Tableau 4 : Etude bibliographique des effets d'inhibiteurs de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales et libres dans les conditions <i>in vivo</i>	44
Tableau 5 : Quantités de radioactivité de 2 solutions de T3 radiomarquée avant précipitation (radioactivité totale), dans les 4 surnageants (S1-S4) issus respectivement de la première centrifugation et des 3 lavages et dans le culot en présence de T3 ou de T4 en excès ; la vitesse et la durée de centrifugation étaient respectivement de 20000g et d'une heure (le bruit de fond de la méthode est de l'ordre de 40). La dernière colonne indique le pourcentage de récupération de la radioactivité totale dans le culot.	57
Tableau 6 : Quantités de radioactivité d'une solution de T3 radiomarquée avant précipitation (radioactivité totale), dans les 4 surnageants (S1-S4) et dans le culot en présence de T4 en excès pour 2 durées de centrifugation : 30 minutes et une heure à 20 000 g. La dernière colonne indique le pourcentage de récupération de la radioactivité totale dans le culot.....	57
Tableau 7 : Concentrations plasmatiques en T3 totale et libre évaluées par dosage radio-immunologique en l'absence et en présence de concentrations plasmatiques croissantes en phénylbutazone.	60
Tableau 8 : Concentrations moyennes globales (\pm écart-type) en T3 totale et libre et T4 totale et libre et pourcentage d'hormones libres (n=6 brebis).	68
Tableau 9 : Valeurs moyennes globales \pm écart-type (n=6 brebis) des concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres observées 4h avant et 1h après et 6h après l'administration de phénylbutazone. Pourcentage de diminution des concentrations plasmatiques 1 h après l'administration de phénylbutazone (*=p<0.05 ; **=p<0.005). PB=Phénylbutazone.....	73

Liste des abréviations

Alb = Albumine
ATP = Adénosine Triphosphate
ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
LDL = Low Density Lipoprotein
FT3 = Concentration en Triiodothyronine libre
FT4 = Concentration en Thyroxine libre
HT = Hormones Thyroïdiennes
IM = Intramusculaire
IV = Intraveineuse
PB = Phénylbutazone
PM = Poids Moléculaire
PS = Prélèvement Sanguin
RBP = Retinol Binding Protein
RIA = Radio-Immuno Assay
SC = Sous-cutanée
T3 = Triiodothyronine
T4 = Thyroxine
TBG = Thyroid Binding Globuline
THX = Thyroïdectomisée
TSH = Thyroid Stimulating Hormone
TRH = Thyrotropin Releasing Hormone
TT3 = Concentration en Triiodothyronine totale
TT4 = Concentration en Thyroxine totale
TTR = Transthyrétine
VO = Voie Orale

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION

1. Les perturbateurs endocriniens

L'industrialisation et l'utilisation d'un nombre croissant de produits chimiques et médicamenteux sont responsables de la dissémination dans l'environnement de substances variées, dont les effets toxicologiques à long terme sont encore mal connus. De nombreuses recherches ont révélé l'implication de ces polluants environnementaux dans l'altération des équilibres endocriniens chez l'homme et les animaux et ce, de manière parfois irréversible. Ces substances, appelées perturbateurs endocriniens, sont désignées comme des " agents exogènes qui interfèrent avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action et l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement " ⁽³⁸⁾.

2. Les insecticides : un exemple de perturbateur de la fonction thyroïdienne

Les études épidémiologiques montrent une incidence accrue, chez l'homme, du cancer de la thyroïde, sans pour autant mettre en évidence l'existence de facteurs étiologiques nutritionnels ou environnementaux. Pour exemple, un rapport récent de l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) montre qu'entre 1978 et 2000, le taux annuel moyen d'évolution de l'incidence de ce type de cancer a été de +2.89 % pour les hommes et de +4.80 % pour les femmes ^(34, 13).

Parmi les facteurs de l'environnement, les pesticides sont désignés comme des agents potentiellement responsables de l'émergence de nouveaux cas de cancer de la thyroïde. Ainsi, le fipronil, principe actif du *Regent* ND (récemment interdit en France) et du médicament le plus utilisé en médecine vétérinaire, apparaît comme étant un agent potentiel de la carcinogenèse thyroïdienne chez le rat ⁽³²⁾.

Selon les résultats des études toxicologiques, l'action du fipronil ne résulterait pas d'un effet mutagène direct mais d'un déséquilibre hormonal, induit par une augmentation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. L'élément clé de cette physiopathologie serait une hypersécrétion prolongée de l'hormone hypophysaire TSH (Thyroid Stimulating Hormone) en réponse à la diminution des concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes ⁽⁴⁴⁾. La TSH contrôle la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes, (cf. chap.1.3. Synthèse des hormones thyroïdiennes) mais gère également la dynamique

cellulaire de la thyroïde, de façon à adapter sa capacité de production aux besoins de l'organisme. Une hyperstimulation prolongée de la thyroïde par la TSH pourrait entraîner un emballement du cycle cellulaire favorisant l'émergence de mutations spontanées, potentiellement carcinogènes.

3. Les lacunes des études réglementaires

Il est vrai que la réglementation impose aux industriels la réalisation d'études toxicologiques afin de s'assurer que l'utilisation de leurs produits n'est pas dangereuse pour l'homme. Les études toxicologiques sont réalisées essentiellement chez le rat. Cependant, les éventuelles modifications endocriniennes observées chez le rat ne peuvent pas toujours être extrapolées à l'homme, en raison des différences physiologiques existant entre ces deux espèces. Ces différences sont particulièrement marquées dans le cas de la fonction thyroïdienne.

En raison du mécanisme d'action potentiel du fipronil vis-à-vis de la fonction thyroïdienne, sa toxicité va dépendre de la spécificité des mécanismes de sécrétion, de transport et de métabolisme des hormones thyroïdiennes. Or, ces mécanismes ne sont pas similaires chez l'homme et le rat. En effet, chez l'homme, le temps de demi-vie de la thyroxine est de plusieurs jours, alors qu'il n'est que de quelques heures chez le rat ⁽²¹⁾. Cette différence est attribuée à l'absence chez le rat de Thyroxine Binding Globulin (TBG), protéine plasmatique de liaison spécifique des hormones thyroïdiennes, qui lie 75% de la thyroxine plasmatique chez l'homme ⁽⁶¹⁾.

De ce fait, le rat ne constitue pas un modèle adapté et pertinent pour l'étude de la toxicité du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez l'homme.

4. Les objectifs du programme de recherche sur l'étude de l'impact du fipronil sur la fonction thyroïdienne

Notre projet s'inscrit dans le cadre du programme de recherche développé par l'UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA/ENVT sur l'évaluation de l'impact du fipronil sur la fonction thyroïdienne. La problématique scientifique qu'il soulève concerne l'importance des protéines de liaison des hormones thyroïdiennes dans le maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne. Il est notamment constaté dans la littérature, une

extrapolation abusive de résultats issus de l'*in vitro* à l'*in vivo* concernant l'influence, sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes, de substances xénobiotiques capables de déplacer les hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines plasmatiques.

Nous nous proposons de mettre en évidence l'importance de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques, en montrant comment cette liaison contrôle les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes. Pour cela, nous évaluerons *in vivo* les variations temporelles des concentrations plasmatiques en hormones totales et libres, observées avant et après l'administration d'un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques.

Pour notre étude, nous avons choisi de développer le modèle ovin. La validité de ce modèle repose sur la physiologie comparable de la glande thyroïde chez l'homme et le mouton, notamment en ce qui concerne le système de stockage des hormones thyroïdiennes plasmatiques, sous la forme d'une liaison de très haute affinité à la TBG.

Le premier chapitre fera l'objet d'un rappel des caractéristiques des hormones thyroïdiennes en s'intéressant à leur synthèse, à leur rôle, à leur métabolisme, à la régulation de leur sécrétion et à leur transport plasmatique.

Un deuxième chapitre présentera les réalisations expérimentales qui ont été mises en œuvre pour répondre aux objectifs de l'étude. Dans un premier temps, nous avons choisi un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques qui peut être administré à la brebis sans risque majeur de toxicité. Dans un deuxième temps, nous avons testé la capacité de la phénylbutazone, inhibiteur retenu, à déplacer les hormones thyroïdiennes de leurs sites de fixation, dans les conditions *in vitro*. Cette approche nous a permis par ailleurs d'évaluer les paramètres de liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques. Dans un troisième temps, nous avons évalué les variations temporelles des concentrations plasmatiques en T3 et T4 totale et libre observées respectivement au cours de la perfusion de T3 et T4 à des brebis thyroïdectomisées avant et après l'administration intraveineuse de phénylbutazone. Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué les paramètres pharmacocinétiques des hormones thyroïdiennes chez les brebis (taux de production, clairance).

CHAPITRE 1 : LA FONCTION THYROÏDIENNE

1. L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien

1.1. La glande thyroïde

La thyroïde est une glande exclusivement endocrine qui sécrète principalement les hormones thyroïdiennes iodées mais également la calcitonine, hormone anti-hypercalcémiant.

D'un point de vue anatomique, la thyroïde est située dans la région cervicale crâniale. Elle est formée de deux lobes reliés entre eux par un isthme, ventralement aux premiers anneaux cartilagineux de la trachée. Chez la brebis adulte, la taille des lobes est d'environ quatre centimètres de long sur deux centimètres de large ⁽²⁸⁾. La thyroïde possède une très riche vascularisation.

D'un point de vue histologique (Cf. figure 1), elle est composée d'une capsule et d'un parenchyme glandulaire. Le parenchyme thyroïdien renferme de nombreuses vésicules. Elles sont sphériques et formées d'une assise de cellules limitant une cavité centrale remplie de colloïde formant l'espace vésiculaire, lieu de stockage des hormones thyroïdiennes ⁽²³⁾.

L'épithélium des vésicules comporte deux types de cellules. Les plus nombreuses, les cellules vésiculaires, cellules thyroïdiennes ou thyrocytes, participent activement à la synthèse des hormones thyroïdiennes. Les cellules paravésiculaires ou cellules claires ou cellules C, moins nombreuses, sécrètent la calcitonine.

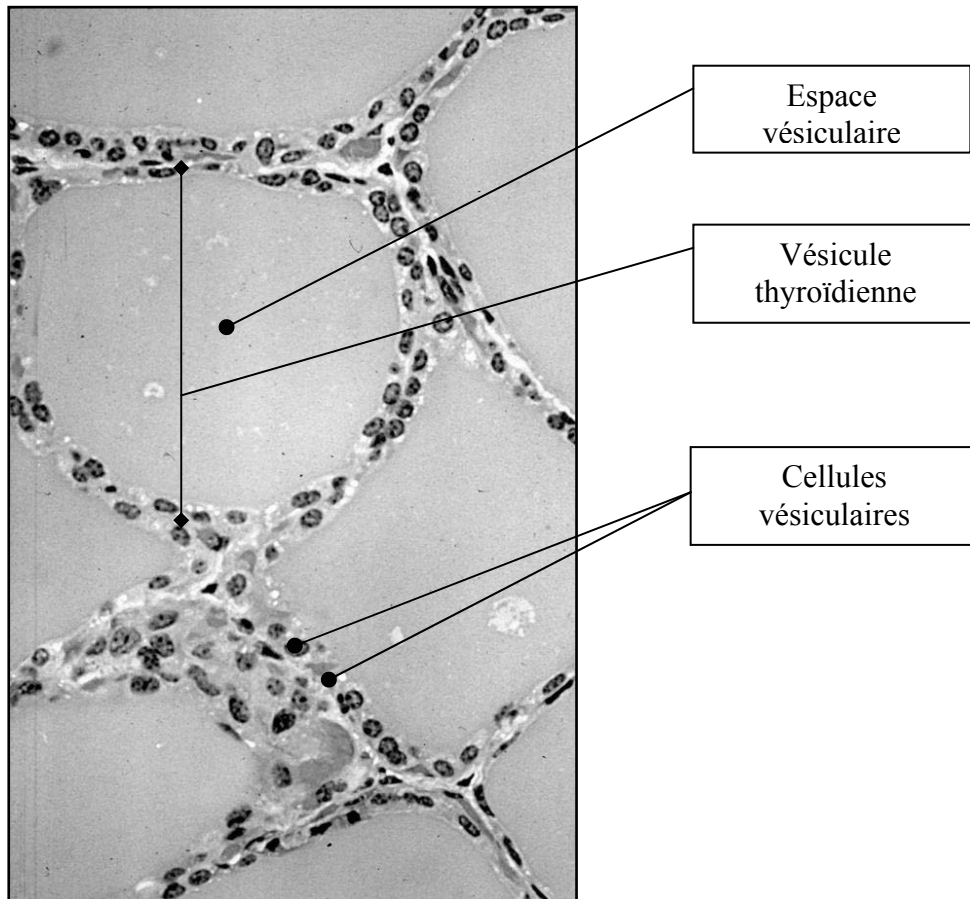


Figure 1 : Coupe histologique du parenchyme de la thyroïde. Photo : Brown Medical School ⁽⁷⁾.

1.2. Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes iodées, représentées par la figure 2, sont des hormones apolaires, synthétisées à partir de résidus tyrosine de la thyroglobuline (cf. Chap.1.3. Synthèse des hormones thyroïdiennes).

Ces hormones sont au nombre de deux :

L-tétraiodothyronine ou thyroxine ou T4 et L-triiodothyronine ou T3 :

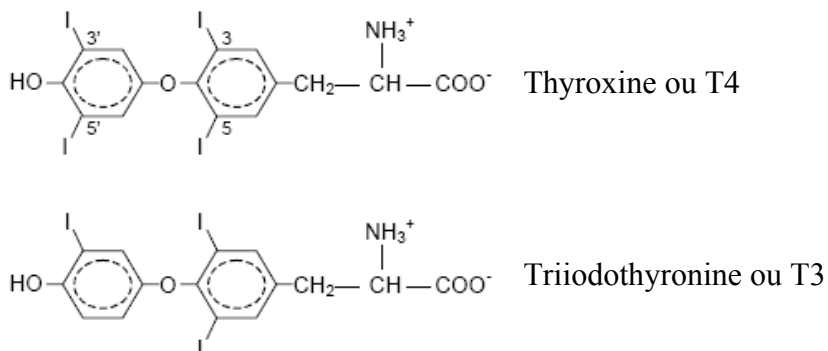


Figure 2 : Les hormones thyroïdiennes T3 et T4

La thyroïde sécrète principalement T4⁽²⁷⁾. La conversion de T4 en T3 se produit dans de nombreux organes notamment le foie, grâce à une enzyme, la thyroxine-5'-désiodase qui réalise la 5'-monodésiodation de T4. Ainsi, 80 % de la T3 provient de la désiodation de la T4 et seulement 20 % provient de la synthèse thyroïdienne⁽²⁵⁾.

Le fait que T3 soit la forme la plus active et que son origine soit principalement la conversion de T4 en T3 au niveau des tissus amène, à considérer T4 comme une pro-hormone⁽³⁶⁾.

C'est ainsi que T4 est considérée comme la « forme circulante » et T3 comme la « forme active ».

1.3. La synthèse des hormones thyroïdiennes

La biosynthèse des hormones iodées thyroïdiennes s'effectue selon un processus particulier. Elle s'opère grâce à un support macromoléculaire représenté par une glycoprotéine : la thyroglobuline, qui joue à la fois un rôle dans l'utilisation des iodures et dans le stockage intra-vésiculaire des hormones thyroïdiennes.

La synthèse de ces hormones implique une succession de phénomènes, dont le déroulement est complexe. De façon schématique, on peut dégager les étapes suivantes :

- Concentration de l'iodure plasmatique : la thyroïde se comporte comme une véritable pompe à iodure concentrant dans la colloïde l'iodure plasmatique provenant de l'absorption intestinale de l'iode alimentaire. Les iodures du sang sont captés par les cellules folliculaires de la thyroïde par un mécanisme de transport actif qui met en jeu un cotransporteur Na^+/I^- . Ce cotransporteur fonctionne grâce à un gradient de Na^+ entretenu par une pompe Na^+/K^+ ATP-ase.
- Oxydation de l'iodure : elle s'effectue grâce à une enzyme, la peroxydase qui catalyse la formation de I^+ ou I^0 à partir d'iodure.
- Organification de l'iode : elle correspond à l'incorporation de l'iode inorganique sur les radicaux tyrosyl de la thyroglobuline. Il y a formation d'iodothyronines, MIT et DIT (Mono-Iodothyrosine et Di-Iodothyrosine). Il se produit ensuite un couplage intramoléculaire des résidus de MIT et DIT, aboutissant à la formation de T3 et de T4 encore fixées à la thyroglobuline.
- Protéolyse de la thyroglobuline : la stimulation physiologique ou expérimentale par la TSH provoque une endocytose de la colloïde par le pôle apical des cellules vésiculaires. Puis, sous l'influence d'enzymes diverses (protéases et peptidases) d'origine lysosomiale, se produit une « digestion » de la thyroglobuline. Il en résulte une libération intra-

cellulaire des iodothyrosines, d'iodopeptides et d'hormones thyroïdiennes iodées. T3 et T4 passent alors dans les capillaires sanguins et lymphatiques péri-vésiculaires et se lient aux protéines plasmatiques. Les autres sous-produits de la synthèse des hormones thyroïdiennes sont en majorité déshalogénés. L'iode libéré est réabsorbé par les cellules vésiculaires pour être réutilisé dans la colloïde ⁽⁴⁰⁾.

1.4. Le catabolisme et l'élimination des hormones thyroïdiennes

Le catabolisme des hormones thyroïdiennes se déroule principalement dans le foie. Il se déroule en deux phases : la première dénature l'hormone et la prépare pour la deuxième phase, à savoir sa conjugaison avec des groupements glucuronate ou sulfate. Cette conjugaison, en augmentant l'hydrosolubilité des hormones thyroïdiennes, facilite l'élimination biliaire ou urinaire.

Après l'élimination biliaire, les hormones thyroïdiennes conjuguées se retrouvent dans l'intestin pour être éliminées par voie fécale. Dans le tube digestif, une hydrolyse libère des groupements glucuronate ou sulfate, 10 à 30 % des hormones éliminées peuvent ainsi être réabsorbés chez l'homme.

Il existe d'autres voies métaboliques du catabolisme des hormones thyroïdiennes. La désamination oxydative puis la décarboxylation aboutit à l'élimination fécale et urinaire de dérivés acétiques (acide tri-iodoacétique (Triac) et tétra-iodoacétique (Tétrac)) d'une part, et de tri-iodothyronamine et de tétra-iodothyronamine d'autre part. Ces déchets du catabolisme peuvent subir une désiodation permettant à l'organisme de recycler l'iode.

Il est important de souligner que ces mécanismes de catabolisme et d'élimination ne concernent que la forme libre des hormones, c'est-à-dire non liée aux protéines plasmatiques.

1.5. Les effets des hormones thyroïdiennes ⁽⁴¹⁾

Les hormones thyroïdiennes contrôlent la maturation de nombreux organes durant la période périnatale et participent au maintien de l'homéostasie chez l'adulte. Elles interviennent dans le développement, la maturation et la croissance de nombreux tissus et organes. La migration des oiseaux, la métamorphose du têtard, la mue des phoques ou le frai du saumon ne sont que quelques exemples de phénomènes naturels, s'accompagnant de fluctuations des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes ⁽⁴⁹⁾.

Dans les phases de développement, l'hypothyroïdisme est associé à un retard de la maturation des os, de la croissance, de l'apparition de la puberté et du développement de l'appareil psychomoteur. Une absence, dès la vie embryonnaire, de la thyroïde est responsable de l'apparition de désordres cérébraux et cérébelleux, mieux connus sous le nom de « crétinisme »⁽⁴⁰⁾.

Les effets de l'injection d'hormones thyroïdiennes ou de TSH ont été étudiés expérimentalement, notamment chez l'agneau⁽⁴²⁾. Suite à l'injection de TSH ou de T3, il est clairement observé une augmentation à la fois, de la consommation en oxygène et du métabolisme de base.

Un rôle essentiel des hormones thyroïdiennes est de favoriser la calorigénèse en augmentant la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP (Adenosine Tri Phosphate) dans de nombreux organes, dont le foie et les muscles. Parallèlement, l'activité des pompes Na^+/K^+ ATP-ases membranaires est très fortement augmentée⁽¹⁷⁾.

Les hormones thyroïdiennes possèdent deux principaux sites d'action. Au niveau du site d'action nucléaire, elles interviennent dans la régulation et la transcription de gènes cibles. Au niveau du site d'action mitochondriale, elles favorisent le découplage des phosphorylations oxydatives.

Sur le plan métabolique, on peut retenir que le passage d'un état euthyroïdien à un état hyperthyroïdien s'accompagne :

- d'une augmentation de la glycolyse et de la glycolyse musculaires, augmentation de la néoglucogénèse hépatique, augmentation de l'absorption intestinale des oses.
- d'une augmentation de la lipolyse et donc du catabolisme des acides gras libres.
- d'une augmentation de la phosphorylation oxydative, donc de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP.
- d'une augmentation de la synthèse du cholestérol avec paradoxalement une diminution de la cholestérolémie liée à une augmentation à la fois du catabolisme de cette molécule en acides biliaires, de son élimination directe dans la bile et de la dégradation des LDL (Low density Lipoprotein).
- d'une augmentation de la synthèse protéique⁽²²⁾.

1.6. La régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes par l'axe hypothalamo-hypophysaire

Il s'agit d'une régulation analogue à celle de la plupart des hormones, impliquant un axe de stimulation hypothalamus-hypophyse-thyroïde et un rétrocontrôle négatif par la forme libre des hormones thyroïdiennes ⁽¹⁸⁾, c'est-à-dire non liée aux protéines plasmatiques.

La TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) hypothalamique stimule la libération de TSH (Thyroid Stimulating Hormone) par l'antéhypophyse qui stimule à son tour la synthèse et la libération des hormones thyroïdiennes T3 et T4.

Le contrôle de la sécrétion des hormones thyroïdiennes implique un rétrocontrôle négatif classique par les hormones thyroïdiennes libres sur la sécrétion de l'hormone hypophysaire TSH et sur la libération de la neurohormone hypothalamique TRH.

Ainsi, une diminution des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes libres entraîne une réduction du contrôle négatif qu'elles exercent sur la sécrétion de TSH et de TRH, qui va aboutir à une augmentation de la sécrétion de TSH et de TRH et donc de T4 et de T3. La figure 3 schématise la régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes.

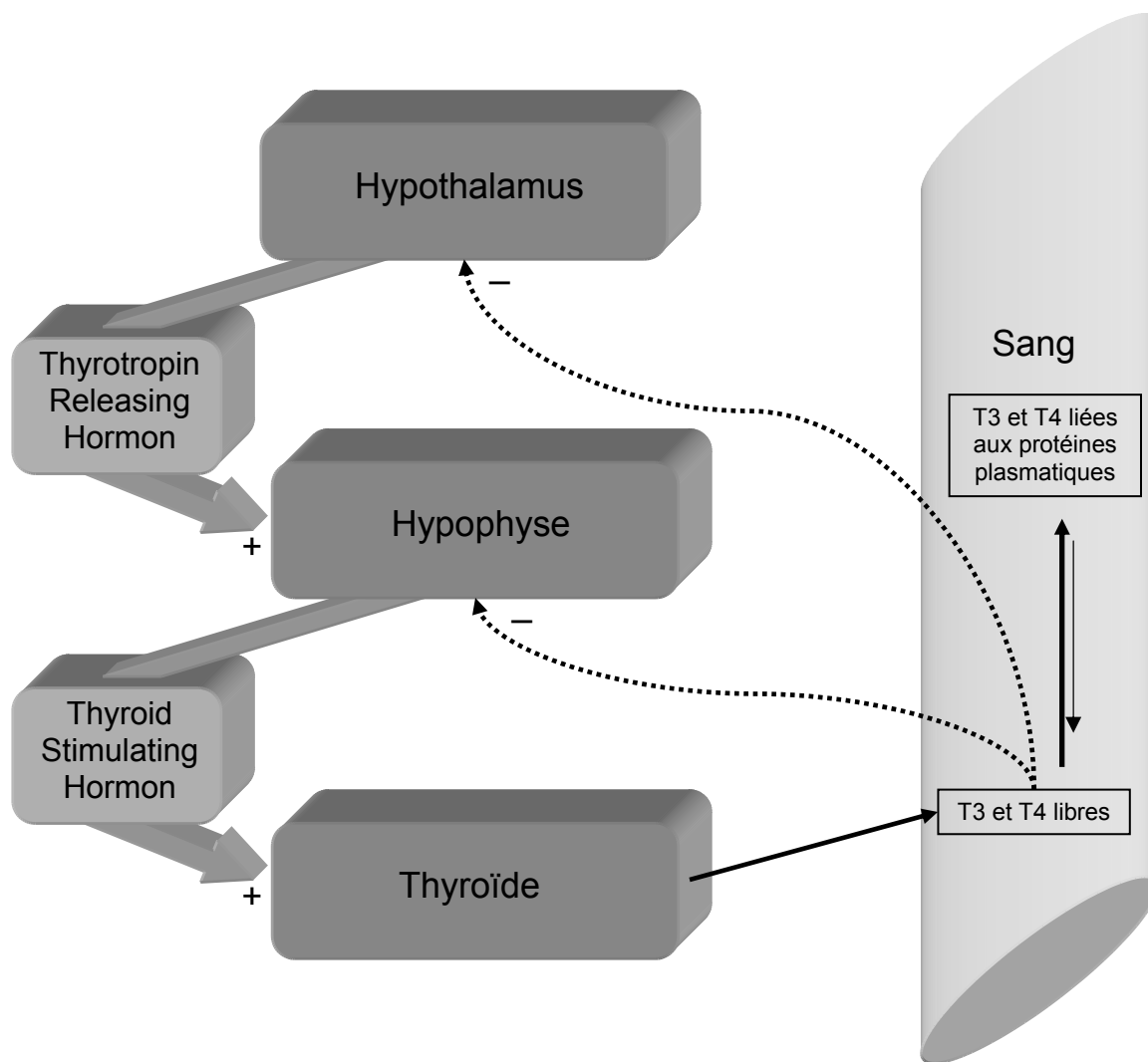


Figure 3 : Axe Hypothalamo-Hypophysio-Thyroïdien de régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes.

2. Le transport plasmatique des hormones thyroïdiennes

2.1. Les protéines de transport

Du fait de leur caractère apolaire, la majeure partie des hormones thyroïdiennes circulantes est liée à des protéines plasmatiques.

Par convention, FT4 et FT3 (F pour free = « libre ») désigneront les concentrations libres des hormones thyroïdiennes. TT4 et TT3 (T pour totale) désigneront les concentrations totales en hormones thyroïdiennes.

Chez l'homme, les fractions libres de T4 et de T3, ne représentent respectivement que 0.03% et 0.3 % des hormones totales ^(51, 57).

Les hormones thyroïdiennes liées aux protéines ne pénètrent pas dans les cellules et sont ainsi considérées comme biologiquement inertes. Seules les hormones sous forme libre peuvent pénétrer dans les cellules, elles constituent donc la fraction active ⁽⁶³⁾.

Les protéines de liaison plasmatique des hormones thyroïdiennes sont la Thyroxine Binding Globulin (TBG), la Thyroxine Binding Prealbumin ou transthyrétine (TTR) et l'albumine. Avec un large excès de T4, d'autres protéines plasmatiques comme les α et β lipoprotéines peuvent transporter les hormones thyroïdiennes. Cependant leur contribution au transport dans les conditions physiologiques est négligeable ⁽²⁹⁾.

Chez l'homme, dans les conditions physiologiques, les fractions de T4 liées à la TBG, à la TTR et à l'albumine représentent respectivement 70 à 75 %, 20 à 25 % et 5 à 10 % ^(61, 72).

Des études utilisant de la T4 radiomarquée ont montré que, chez l'homme, 31 % de T4 est présente dans le foie, 44 % dans les muscles, le cerveau et la peau et les 22 % restant se trouvent dans le plasma. La distribution de T3 est différente, seulement 5 % est dans le foie, 18 % dans le plasma et 75 % dans le reste de l'organisme ^(9, 35, 48). En conséquence, les protéines plasmatiques fixent environ 20 % de la quantité d'hormones thyroïdiennes totales d'un organisme. Les protéines de transport fonctionnent comme un réservoir d'hormones thyroïdiennes circulantes alors que les hormones libres, présentes à de faibles concentrations, entrent dans les cellules pour exercer leurs effets biologiques.

La liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques est responsable de leur persistance dans la circulation générale, reflétée par le temps de demi-vie, qui est de 6 jours chez l'homme contre 12 heures chez le rat, espèce ne possédant pas de TBG ⁽²¹⁾.

Il est ainsi généralement admis que les protéines de liaison ont un rôle de préservation des hormones thyroïdiennes en limitant leur élimination et leur utilisation par les tissus.

Un deuxième rôle de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques serait de participer à la limitation des pertes en iode ⁽¹⁰⁾. En effet, la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines de transport leur confère des propriétés de macromolécule. Les pertes urinaires en iode sont de ce fait limitées. L'abondance d'iode dans le milieu marin pourrait d'ailleurs expliquer l'absence de protéines de transport à une forte affinité pour les hormones thyroïdiennes chez les poissons ⁽⁵⁷⁾. Les autres mécanismes qui participent à la conservation de l'iode sont le stockage sous forme de thyroglobuline dans la colloïde et la recirculation intrathyroïdienne de l'iode.

Intéressons nous maintenant aux caractéristiques des trois principales protéines de transport plasmatiques des hormones thyroïdiennes.

2.1.1. La Thyroxine-Binding Globulin (TBG)

La TBG est une α 1-glycoprotéine acide synthétisée par le foie. Elle a un poids moléculaire de 54 000 Da ⁽¹⁹⁾. Elle possède un seul site de fixation, dont l'affinité pour T4 est supérieure à celle pour T3 ⁽³⁰⁾. La TBG est la protéine de transport des hormones thyroïdiennes la moins abondante, sa concentration est environ vingt fois moins importante que celle de la Transthyrétine (TTR) et deux mille fois moins importante que celle de l'albumine. Elle transporte cependant jusqu'à 75% de T3 et T4 chez l'homme ⁽²⁰⁾. Cette caractéristique est due à une constante de dissociation pour T3 et T4 très faible, environ cent fois inférieure à celle de la TTR. Chez l'homme, la concentration plasmatique en TBG est d'environ 0.16 mg/mL ⁽⁵⁵⁾ et sa demi-vie est d'environ 5 jours ⁽⁸⁾.

Un grand nombre de composés peuvent entrer en compétition avec les hormones thyroïdiennes au niveau du site de liaison de la TBG, sûrement en raison d'une similarité dans la structure entre ces composés et les hormones thyroïdiennes.

2.1.2. La Transthyrétine ou Thyroxine Binding Prealbumin (TTR ou TBPA)

La capacité de la TTR à transporter les hormones thyroïdiennes a été mise en évidence en 1958 ⁽³³⁾ et ce n'est que bien plus tard que la capacité de la TTR à se complexer avec la Rétinol Binding Protein (RBP) et son rôle dans le transport de la vitamine A ont été

démontrés ⁽⁵⁴⁾. La TTR est synthétisée dans le foie. Elle circule sous forme d'un tétramère composé de 4 sous unités qui se lient pour former une structure symétrique. Un tunnel traversant la structure constitue les deux sites de liaison de deux molécules d'hormones thyroïdiennes ⁽⁵⁾. La liaison d'une première molécule d'hormone thyroïdienne au premier site diminue considérablement l'affinité du deuxième site pour une autre hormone thyroïdienne. La complexation de la TTR avec RBP ne modifie pas l'affinité pour les hormones thyroïdiennes et réciproquement. En revanche, la complexation de la TTR avec la RBP stabilise le lien entre RBP et la vitamine A ⁽³⁶⁾.

Bien que la TTR présente une concentration plasmatique environ 20 fois supérieure à celle de la TBG, sa participation dans le transport des hormones thyroïdiennes est moins importante. Chez l'homme, le pourcentage de T4 liée à la TTR est de 17% ⁽³⁶⁾ et seulement 0.5 % de la TTR circulante lie la T4. Elle semble donc jouer un rôle plus important dans le transport de la vitamine A que dans celui des hormones thyroïdiennes.

Chez l'homme, la concentration moyenne en TTR est d'environ 2.5 mg/mL et sa demi-vie est d'environ 2 jours. L'affinité pour la première molécule de T4 est environ cent fois plus grande que celle de l'albumine pour T4 et cent fois plus faible que celle de la TBG pour T4 ⁽⁵⁵⁾.

2.1.3. L'Albumine (Alb)

L'albumine circule dans le sérum principalement sous la forme d'un monomère. Elle peut s'agglomérer pour former des dimères, des trimères ou des tétramères ⁽¹⁹⁾. Elle a la capacité de fixer une grande variété de substances incluant les hormones et les médicaments possédant une région hydrophobe. La liaison entre l'albumine et les hormones thyroïdiennes est considérée comme non spécifique et non saturable. Du fait de son abondance dans le sérum et en dépit de sa faible affinité pour T3 et T4, sa contribution au transport des hormones thyroïdiennes ne peut pas être négligée. D'un autre côté, de larges fluctuations dans la concentration en albumine ont peu de conséquences sur la concentration en hormones thyroïdiennes totales. Parmi les 5 ou 6 sites de liaison potentiels de l'albumine à la T4, un seulement ayant une constante d'affinité relativement importante, est impliqué dans le transport de T3 et T4 ⁽²⁰⁾.

Un récapitulatif des propriétés de chaque protéine de transport chez l'homme, le rat et les ovins, est donné dans le tableau 1 ci-dessous.

	TBG	TTR	ALB
Poids moléculaire (Da)	54000	55000	69000
Structure	monomère	tétramère	Monomère principalement
Nombre de sites de liaison pour T3 et T4	1	2	5-6 mais 1 seul ayant une grande affinité
Constante de dissociation <i>Kd</i> (nmol/L) pour T4 :			
Homme	0.105	6.25	2780
Ovin	0.112	7.14	2860
Rat	-	2.78	1540
Concentration plasmatique chez l'homme (mg/mL)	0.16	2.5	400
Capacité de liaison <i>Bmax</i> (nmol de T4/L)			
Homme	266.6	3229.6	51.3 .10 ⁶
Ovin	160	4494	35.2 .10 ⁶
Rat	-	3968.2	30.2 .10 ⁶
Temps de demi vie chez l'homme (jours)	5	2	15

Tableau 1 : Propriétés des protéines de liaison des hormones thyroïdiennes (TBG, TTR et Albumine) chez l'homme ⁽²⁾, les ovins et le rat ⁽⁶⁶⁾.

2.1.4. Les variations interspécifiques

Il existe des variations interspécifiques nettes concernant la TBG. Certaines espèces comme le rat ou le chat en sont dépourvues alors que d'autres comme l'homme, le cheval, la vache ou la brebis synthétisent cette protéine (Tableau 2). Etant donné qu'il s'agit de la protéine de transport ayant de loin la plus forte affinité avec les hormones thyroïdiennes, son absence entraîne des différences physiologiques importantes.

Espèce	Thyroxine Binding Globulin	Transthyréline	Albumine
Porc	93	-	7
Chien	60	28	12
Cheval	61	22	17
Homme	73	17	10
Chat	-	39	61
Vache	60	20	20
Brebis	53.1	35.6	11.3
Rat	-	85.1	14.9

Tableau 2 : Pourcentage de T4 liée aux protéines plasmatiques chez différentes espèces ⁽²⁰⁾.

2.2. Les paramètres de liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques

La liaison des hormones aux protéines plasmatiques de transport est non covalente et réversible. Elle peut être présentée sous la forme d'un équilibre obéissant à la loi d'action de masse.

La liaison spécifique de T4 à la TBG peut s'écrire :



F représente la concentration de la forme libre de T4.

B représente la concentration en hormones thyroïdiennes liées aux protéines de transport.

B_{\max} est la concentration en site de liaison de la TBG. Elle représente la capacité maximale de liaison et exprime le fait que la liaison des hormones thyroïdiennes à la TBG est saturable.

TBG représente la forme libre de la TBG (soit $B_{\max} - B$).

La constante d'affinité Ka exprime et quantifie le niveau d'affinité entre la protéine plasmatique et la substance fixée. Plus Ka est grande, plus l'affinité est forte.

La constante d'affinité Ka_{TBG} de T4 pour la TBG est définie par l'équation 1.

$$Ka_{\text{TBG}} = \frac{B}{F(B_{\max} - B)} \quad (\text{équation 1})$$

La constante de dissociation Kd est définie comme étant l'inverse de Ka .

$$Kd_{\text{TBG}} = 1 / Ka_{\text{TBG}} \quad (\text{équation 2})$$

Kd_{TBG} est la concentration en hormones thyroïdiennes libres permettant de saturer la moitié des sites de liaison de la TBG. Comme Ka , Kd exprime et quantifie le niveau d'affinité entre la protéine et la substance fixée. Plus Kd est grande, plus l'affinité est faible.

A partir des équations 1 et 2, B peut être exprimé en fonction de F :

$$B = \frac{B_{\max \text{ TBG}} \times F}{Kd_{\text{TBG}} + F} \quad (\text{équation 3})$$

La figure 4 représente l'évolution de la concentration en hormones liées spécifiquement à la TBG (B) en fonction des concentrations en hormones libres (F).

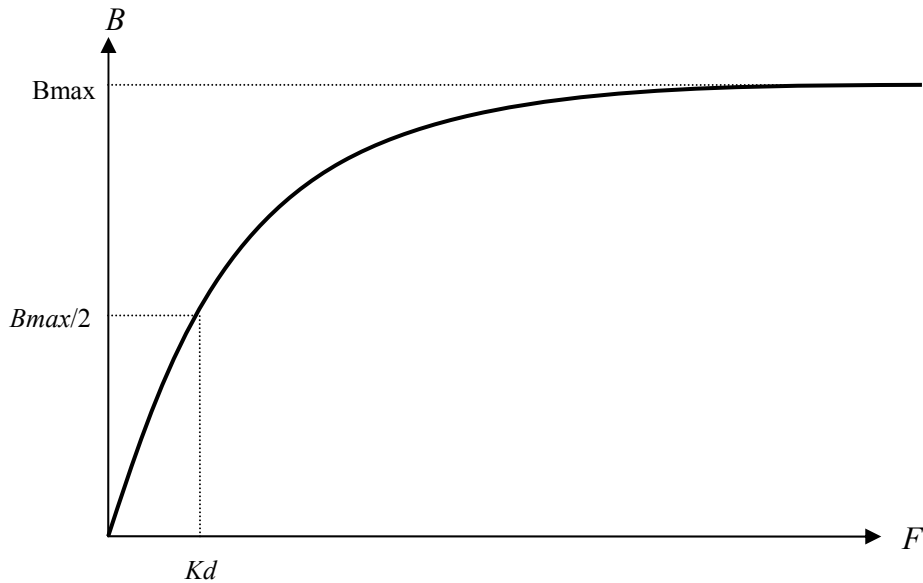


Figure 4 : Evolution des concentrations en hormones thyroïdiennes liées à la TBG (B) en fonction de la concentration en hormones thyroïdiennes libres (F).

Cependant, dans les conditions *in vivo*, les hormones thyroïdiennes ne se lient pas seulement à la TBG. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la contribution de la TTR et de l'albumine au transport des hormones thyroïdiennes ne peut pas être négligée. L'équilibre de liaison des hormones thyroïdiennes, dans les conditions *in vivo*, fait donc intervenir les 3 protéines de transport et s'écrit :



D'après cet équilibre, dans les conditions *in vivo*, la concentration en hormones thyroïdiennes liées, c'est-à-dire B , s'exprime de la façon suivante :

$$B = B_{TBG} + B_{TTR} + B_{Alb}$$

B_{TBG} représente la concentration plasmatique en hormones thyroïdiennes liées à la TBG, B_{TTR} représente la concentration plasmatique en hormones thyroïdiennes liées à la TTR et B_{Alb} représente la concentration plasmatique en hormones thyroïdiennes liées à l'albumine.

En s'aidant de l'équation 3 et en l'adaptant à chaque protéine de transport on obtient l'équation 4.

$$B = \frac{B_{\max TBG} \times F}{Kd_{TBG} + F} + \frac{B_{\max TTR} \times F}{Kd_{TTR} + F} + \frac{B_{\max Alb} \times F}{Kd_{Alb} + F} \quad (\text{équation 4})$$

La liaison des hormones thyroïdiennes à l'albumine est non saturable. De plus, selon la littérature, la capacité maximale de liaison des hormones thyroïdiennes à la TTR est très

supérieure chez les ovins ($B_{max_{TTR}} = 4621 \text{ nM}^{(75)}$), aux concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes. Par conséquent, nous avons considéré que cette liaison était non saturable. De plus, étant donné que les constantes de dissociation de la TTR et de l'albumine pour les hormones thyroïdiennes ($Kd_{TTR} = 7,14 \text{ nmol/L}$; $Kd_{Alb} = 2860 \text{ nmol/L}$) sont très grandes devant les valeurs de F ($FT4 = 2,25 \cdot 10^{-2} \text{ nmol/L}$; $FT3 = 3,37 \cdot 10^{-3} \text{ nmol/L}^{(57)}$). Nous pouvons considérer que F est négligeable devant Kd_{TTR} et Kd_{Alb} .

Ainsi l'équation 4 s'écrit :

$$B = \frac{B_{\max TBG} \times F}{Kd_{TBG} + F} + \frac{B_{\max TTR} \times F}{Kd_{TTR}} + \frac{B_{\max Alb} \times F}{Kd_{Alb}} \quad (\text{équation 5})$$

Après factorisation de F nous obtenons l'équation 3 :

$$B = \frac{B_{\max TBG} \times F}{Kd_{TBG} + F} + F \left(\frac{B_{\max TTR}}{Kd_{TTR}} + \frac{B_{\max Alb}}{Kd_{Alb}} \right) \quad (\text{équation 6})$$

$\left(\frac{B_{\max TTR}}{Kd_{TTR}} + \frac{B_{\max Alb}}{Kd_{Alb}} \right)$ est une constante que nous noterons NS . C'est la constante de liaison non spécifique de T3 (ou T4) à la TTR et à l'albumine.

L'équation 6 ci-dessus devient :

$$B = \frac{B_{\max TBG} \times F}{Kd_{TBG} + F} + NS.F \quad (\text{équation 7})$$

L'équation 7 nous permettra d'évaluer les B_{max} , Kd et NS à partir des données expérimentales des concentrations en hormones thyroïdiennes libres et liées.

2.3. Manipulations pharmacologiques de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques

De nombreuses substances peuvent interagir avec la fonction thyroïdienne. Ces substances peuvent intervenir à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien ainsi qu'au niveau de la synthèse, du transport ou du catabolisme des hormones thyroïdiennes. Pour citer un exemple, le dioxyde de chlore, désinfectant pour piscine, serait un perturbateur de la

synthèse des hormones thyroïdiennes ⁽⁷³⁾. Il provoquerait une diminution des concentrations plasmatiques de T4, en inhibant le symport Na^+/I^- et donc la capture d'iode par la thyroïde.

Le tableau 3 fait la liste non exhaustive des substances qui interagissent avec le transport des hormones thyroïdiennes.

Les substances qui affectent le transport des hormones thyroïdiennes peuvent agir en augmentant ou en diminuant la concentration plasmatique en TBG. Il y a, dans ce cas, modification de la capacité maximale de liaison de la TBG ou B_{max} .

Certaines substances peuvent également se fixer sur les sites de liaison de T3 et T4 aux protéines de transport plasmatiques. On parle dans ce dernier cas d'inhibition compétitive entraînant une augmentation de la constante apparente de dissociation à l'équilibre du complexe protéine-hormone thyroïdienne.

Effet	Substances
Augmentation la concentration plasmatique en TBG	Oestrogènes ⁽⁵¹⁾ Héroïne ⁽²⁾ 5-fluorouracile ⁽⁴⁾ Perphénazine ⁽⁵⁰⁾
Diminution la concentration plasmatique en TBG	Androgènes ^(3, 6) Glucocorticoïdes ⁽⁵³⁾ L-asparaginase ⁽²⁴⁾
Inhibiteurs compétitifs de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques	Salicylates ^(12, 39) Phénytoïnes et ses analogues (diazépam) ^(39, 52, 60) Furosémide ⁽⁶⁴⁾ Dinitrophénol ⁽¹²⁾ Acides gras libres ^(31, 67) op'DDD ⁽⁴³⁾ Phénylbutazone ⁽¹⁾ Halofénate ⁽¹⁵⁾ Fenclofénac ⁽⁶⁸⁾ Anions monovalents (SCN^- , ClO_4^-) ⁽⁴⁵⁾ Acide méclofénamique ^(14, 59)

Tableau 3 : Substances ayant un effet sur le transport des hormones thyroïdiennes.

2.4. Fraction libre et concentration en hormone libre : les bases de la confusion ⁽⁶⁹⁾

Dans les systèmes cellulaires développés pour étudier les effets des hormones, une augmentation des concentrations en hormones libres peut être obtenue en ajoutant un inhibiteur de la liaison de cette hormone à sa protéine de transport. De façon erronée, il est couramment admis que cette approche méthodologique peut être développée *in vivo* pour augmenter les concentrations en hormones libres et potentialiser leurs effets. Or, dans les conditions *in vivo*, le déplacement de la liaison devrait se traduire par une augmentation transitoire des concentrations plasmatiques en hormones libres, suivie d'un rapide retour à l'état d'équilibre. En effet, la fraction de l'hormone non liée de façon spécifique aux protéines de transport étant seule soumise aux processus de clairance et de distribution, l'augmentation de cette fraction devrait se traduire par un accroissement de la vitesse d'élimination et un retour des concentrations en hormones libres aux valeurs initiales.

« Dans le plasma, des modifications de la liaison des molécules engendrent une diminution (ou une augmentation) de la fraction non liée et de ce fait une diminution (ou une augmentation) de l'effet ».

Cette considération classique, présente dans de nombreux articles, est erronée. Selon Toutain et Bousquet-Melou ⁽⁶⁹⁾, elle provient de la confusion entre 2 variables : la fraction libre d'une molécule dans le plasma (f_u) et sa concentration plasmatique (C_{libre} ou F). Les équations suivantes proviennent de l'article de Toutain et Bousquet-Melou ⁽⁶⁹⁾.

L'effet des hormones thyroïdiennes dépend de leurs concentrations en forme libre. De ce fait, il peut être modifié par des facteurs qui altèrent cette concentration mais pas par ceux qui entraînent une modification de la fraction libre. Les équations suivantes proviennent de l'article de Toutain et Bousquet-Melou ⁽⁶⁹⁾.

Par définition f_u est donné par la relation :

$$f_u = F / C_{\text{tot}} \quad (\text{équation 8})$$

où C_{tot} est la concentration plasmatique en hormone totale.

La confusion entre f_u et C_{tot} survient lors du réarrangement de l'équation 8 en équation 9.

$$F = f_u \times C_{\text{tot}} \quad (\text{équation 9})$$

Par définition, C_{tot} est donnée par la relation :

$$C_{\text{tot}} = F + B \quad (\text{équation 10})$$

où B est la concentration en hormones liées et F la concentration en hormones libres.

Pour les molécules qui possèdent une famille unique de sites de liaison (sites de liaison caractérisés par la même constante d'affinité K_d), nous avons montré que B est donnée par l'équation 3 (Cf. Chapitre 1.2.2. Les paramètres de liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques) :

$$B = \frac{B_{\max} \times F}{Kd + F} \quad (\text{équation 3})$$

où B_{\max} est la capacité maximale de liaison (en relation avec la concentration molaire de la protéine de transport) et K_d est la constante de dissociation à l'équilibre (égale à l'inverse de K_a).

En incorporant l'équation 3 dans l'équation 10 on obtient :

$$C_{\text{tot}} = F + \frac{B_{\max} \times F}{Kd + F} \quad (\text{équation 11})$$

Après factorisation on obtient :

$$C_{\text{tot}} = F \times \left[\frac{Kd + F + B_{\max}}{Kd + F} \right] \quad (\text{équation 12})$$

Des équations 8 et 12 on déduit une expression de fu :

$$fu = \frac{Kd + F}{B_{\max} + Kd + F} \quad (\text{équation 13})$$

2.4.1. Dans les conditions *in vitro*

Dans les conditions *in vitro*, la concentration en hormones thyroïdiennes totales est fixe.

Nous avons vu précédemment que la quantité d'hormones liées à la TBG est égale à :

$$B = \frac{B_{\max} \times F}{Kd + F} \quad (\text{équation 3})$$

Dans les conditions *in vitro* et en présence d'un inhibiteur, la concentration en hormones thyroïdiennes liées B devient :

$$B = \frac{B_{\max} \times F}{Kd' + F}$$

$$\text{avec } Kd' = Kd \cdot \left(1 + \frac{F_{inh}}{Kd_{inh}} \right)$$

Kd' est la constante apparente de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-HT qui correspond à la concentration de l'hormone libre qui permet de saturer la moitié des sites de liaison de la TBG en présence d'inhibiteur (cf. figure 3).

F_{inh} est la concentration en inhibiteur libre.

Kd_{inh} est la constante apparente de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-compétiteur qui correspond à la concentration en inhibiteur libre qui permet de saturer la moitié des sites de liaison de la TBG.

L'ajout d'un inhibiteur va se traduire par une augmentation de F et une diminution de B car la valeur de la nouvelle constante de dissociation apparente Kd' est supérieure à la valeur initiale de Kd (cf. Chapitre 1.2.6. Les manipulations pharmacologiques du transport des hormones thyroïdiennes).

La schématisation des variations des concentrations en hormones thyroïdiennes dans les conditions *in vitro*, suite à la présence d'un inhibiteur compétitif, est donnée par la figure 5.

2.4.2. Dans les conditions *in vivo*

L'équation 13 nous montre que fu dépend de la concentration libre F et des deux paramètres de liaison B_{\max} et Kd .

In vivo, pour de nombreuses molécules dont les hormones thyroïdiennes, la valeur des concentrations plasmatiques en hormones libres est négligeable devant le Kd ($Kd \gg F$). De ce fait l'équation 13 peut être simplifiée selon l'équation 14.

$$fu = Kd (B_{\max} + Kd) \quad (\text{équation 14})$$

Dans cette situation, fu est indépendant de F . La liaison plasmatique est de ce fait caractérisée par une valeur constante de fu dans l'intervalle des concentrations rencontrées *in vivo*. Ainsi, fu est uniquement fonction de Kd et de B_{\max} .

Les deux facteurs majeurs déterminant la concentration plasmatique d'un composé endogène sont son taux d'entrée dans le plasma ($Tx_{\text{entrée}}$) et son taux d'élimination ($Tx_{\text{élimin.}}$). Par définition, le taux d'élimination d'une molécule est donné par la relation :

$$Tx_{\text{élimin}} = Cl_{\text{tot}} \times C_{\text{tot}} = Cl_{\text{libre}} \times F \quad (\text{équation 15})$$

Avec Cl_{tot} et Cl_{libre} respectivement les clairances des molécules totales et libres.

L'état d'équilibre est atteint quand le taux d'élimination devient égal au taux d'entrée dans la circulation générale :

$$Tx_{\text{entrée}} = Tx_{\text{élimin.}} \quad (\text{équation 16})$$

On peut déduire des équations 15 et 16 que la concentration plasmatique à l'équilibre ($C_{\text{éq}}$) est fonction seulement du $Tx_{\text{entrée}}$ et de la clairance de la molécule :

$$C_{\text{éq}} = Tx_{\text{entrée}} / Cl \quad (\text{équation 17})$$

Les concentrations plasmatiques en hormones totales et libres à l'équilibre ($C_{tot, \acute{e}q}$ et $F_{\acute{e}q}$) sont fonction de leur clairance respective :

$$C_{tot, \acute{e}q} = Tx_{\text{entrée}} / Cl_{tot} \quad (\text{équation 18})$$

$$F_{\acute{e}q} = Tx_{\text{entrée}} / Cl_{libre} \quad (\text{équation 19})$$

De ce fait, des variations de fu peuvent modifier l'état d'équilibre seulement par leurs influences sur la clairance totale ou libre.

D'après la littérature, pour les molécules ayant un faible taux d'extraction, quelque soit le mécanisme d'élimination, Cl_{tot} est proportionnelle à fu et Cl_{libre} est indépendante de fu ⁽⁵⁸⁾.

Ceci peut être simplement illustré par l'exemple d'une molécule uniquement éliminée par le foie et pour laquelle l'équation suivante peut être utilisée :

$$Cl_{tot} = fu \times Cl_{int} \quad (\text{équation 20})$$

$$Cl_{libre} = Cl_{int} \quad (\text{équation 21})$$

où Cl_{int} est la clairance hépatique intrinsèque, déterminée par les capacités métaboliques du foie.

En substituant les équations 18 et 19 dans les équations 20 et 21, on obtient :

$$C_{tot, \acute{e}q} = \frac{Tx_{\text{entrée}}}{fu \times Cl_{int}} \quad (\text{équation 22})$$

$$F_{\acute{e}q} = \frac{Tx_{\text{entrée}}}{Cl_{int}} \quad (\text{équation 23})$$

Ces relations nous montrent qu'avec des molécules ayant un faible taux d'extraction, comme les hormones thyroïdiennes par exemple, la concentration libre à l'état d'équilibre ($F_{\acute{e}q}$) dépend seulement de $Tx_{\text{entrée}}$ et de Cl_{int} et que les modifications de fu vont influencer les concentrations en hormones totales à l'équilibre, mais pas les concentrations en hormones libres.

Lorsque deux molécules peuvent se lier au niveau du même site de fixation, c'est-à-dire lors d'inhibition compétitive, on observe une augmentation de la constante apparente de dissociation Kd .

Quand l'équilibre est atteint, puisque Kd augmente, on peut affirmer d'après l'équation 14, que fu augmente et d'après les équations 22 et 23, si fu augmente C_{tot} diminue mais F ne varie pas.

F peut transitoirement augmenter jusqu'à la redistribution et l'élimination de la petite quantité de molécules déplacées. Cette élimination et cette redistribution font que la situation *in vivo* est radicalement différente de la situation *in vitro* dans laquelle la concentration totale

est fixée expérimentalement et où les phénomènes de redistribution et d'élimination physiologiques n'ont pas lieu.

Finalement, pour la plupart des molécules, une modification de la liaison aux sites de transport doit mener seulement à une modification de C_{tot} .

La schématisation graphique des variations prédites des concentrations en hormones thyroïdiennes, après l'ajout d'un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques, est donnée par la figure 5.

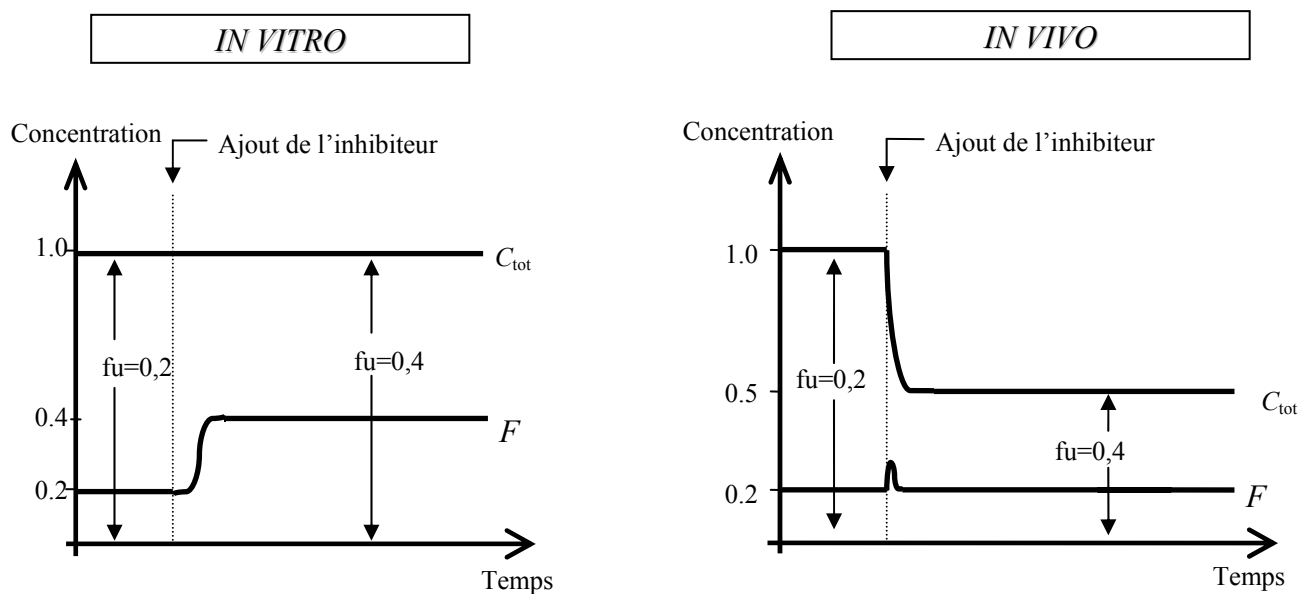


Figure 5 : Variations prédites selon Toutain et Bousquet-Melou ⁽⁶⁹⁾ des concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres dans les conditions *in vitro* et *in vivo* à la suite de l'ajout d'un inhibiteur compétitif de la liaison des HT aux protéines plasmatiques.

CHAPITRE 2 : REALISATIONS EXPERIMENTALES

L'objectif de notre étude est de valider expérimentalement notre hypothèse, selon laquelle les effets des manipulations pharmacologiques de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques réalisées *in vitro* ne peuvent pas être extrapolés aux conditions expérimentales qui président *in vivo*. L'ajout d'un inhibiteur compétitif devrait entraîner, *in vitro*, une augmentation des concentrations en hormones thyroïdiennes libres. Dans les conditions *in vivo*, l'administration d'un inhibiteur compétitif devrait se traduire par une diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales sans variations des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes libres.

L'objet de la première partie du chapitre 2, « Réalisations expérimentales », sera de présenter les essais pilotes réalisés dans le but de choisir un inhibiteur potentiel de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques qui pourra être administré, *in vivo*, à la brebis.

La deuxième partie exposera les expérimentations que nous avons réalisées pour évaluer, dans les conditions *in vitro*, le déplacement des hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines de transport par l'inhibiteur retenu.

Enfin, la troisième partie présentera les réalisations expérimentales que nous avons mises en œuvre pour évaluer l'effet de l'administration de la phénylbutazone, inhibiteur choisi, sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales et libres dans un modèle de brebis chez lequel les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes sont parfaitement contrôlées et maintenues constantes.

1. Identification d'un inhibiteur compétitif

Des essais pilotes ont été réalisés afin d'identifier et de choisir un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques, qui peut être administré à la brebis sans risque majeur de toxicité. A partir d'une analyse bibliographique des données expérimentales, nous avons sélectionné trois inhibiteurs potentiels de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques et nous avons évalué leurs effets, *in vivo*, sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales et libres. Selon notre hypothèse, l'administration d'un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques doit conduire à une diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales, sans affecter les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes libres.

Le tableau 4 illustre les résultats de l'analyse bibliographique des données de la littérature concernant les effets de plusieurs inhibiteurs sur les concentrations en hormones totales et libres dans les conditions *in vivo*. Les inhibiteurs compétitifs testés sont entre autres, le salicylate ⁽¹²⁾ et l'acide acétylsalicylique ⁽³⁹⁾, le diphénylhydantoïne ^(39, 52, 60), la phénylbutazone ⁽¹⁾, l'acide méclofénamique ^(14, 59) et le furosémide ⁽⁶⁴⁾.

Les données expérimentales ont été obtenues chez plusieurs espèces (homme, chien, cheval et rat).

Inhibiteurs	Dose, voie et durée	Esp.	Réf.	TT4	TT3	FT4	FT3
Acide acétylsalicylique ⁽³⁹⁾	25 mg/kg/12h pdt 7j	Cn	14	↓	↓	↓	#
	1000 mg dose unique	Ho	59	→	↓	→	↓
	1000 mg /8h pdt 7j	Ho	59	↓	↓	→	↓
Kétoprofène	1mg/kg/24h pdt 7j	Cn	14	↓	↓	↓	#
Salicylate ⁽¹²⁾	60-65 mg/kg dose unique VO	Ho	71	↓	↓	↓	↓
	1000 mg dose unique	Ho	59	↓	↓	↓	↓
	1000 mg/8h pdt 7j	Ho	59	↓	↓	↓	↓
	20 mg/kg	Rat	26	#	#	→	#
Diphenylhydantoïne ^(39, 52, 60)	0.5mM	Rat	26	#	#	→	#
Phénylbutazone ⁽¹⁾	4.4 mg/kg/12h IV pdt 5j	Cv	56	↓	#	↓	#
	8-10 mg/kg/12h IV pdt 5j	Cv	46	↓	#	↓	#
Acide méclofénamique	100 mg dose unique	Ho	14	↑	↑	→	↑
	100 mg/8h pdt 7j	Ho	59	→	→	→	→
Furosémide	500 mg VO dose unique	Ho	65	↓	↓	↑	#

Tableau 4 : Etude bibliographique des effets d'inhibiteurs de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales et libres dans les conditions *in vivo*. Espèces : Cn = Chien ; Ho = Homme ; Cv = Cheval. Variations : ↑ = augmentation ; ↓ = diminution ; → = pas de variation ; # = résultat non présenté. Les quatre dernières colonnes présentent les variations des concentrations en hormones thyroïdiennes observées. Les cases grisées représentent les résultats qui sont en accord avec notre hypothèse.

Cette synthèse bibliographique nous montre que les effets des inhibiteurs sur les concentrations en hormones thyroïdiennes libres et totales sont très disparates entre les études.

La majorité des expérimentations *in vivo*, mettent en évidence une diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales, suite à l'administration d'un compétiteur potentiel. En revanche, un nombre important d'essais *in vivo* concluent également à une diminution de FT4 et/ou FT3 après l'administration de l'inhibiteur. Certains Les divergences de ces résultats avec notre hypothèse pourraient être expliquées par un effet de ces substances sur la sécrétion ou l'élimination des hormones thyroïdiennes indépendamment de leur effet inhibiteur de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques.

C'est pour cette raison que nous avons choisi de développer le modèle de la brebis thyroïdectomisée et supplémentée en hormones thyroïdiennes. Dans ce modèle, le taux d'entrée des hormones thyroïdiennes dans la circulation est totalement contrôlé.

Nous avons choisi de tester comme inhibiteurs potentiels de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques, le furosémide, la phénylbutazone et l'acide méclofénamique car ces trois molécules sont couramment utilisées en médecine vétérinaire.

Le furosémide est une substance dotée de propriétés salidiurétiques. La phénylbutazone et l'acide méclofénamique sont deux anti-inflammatoires non stéroïdiens utilisés pour combattre les syndromes inflammatoires ou douloureux des systèmes ostéo-articulaires ou musculo-squelettiques.

1.1. Matériels et méthodes

1.1.1. Méthodes analytiques

Les concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres ont été évaluées par ELISA (kit DSL).

1.1.2. Protocole expérimental

Deux essais pilotes ont été réalisés, le premier avec 4 brebis non thyroïdectomisées et le deuxième avec 2 brebis thyroïdectomisées depuis plus de 6 mois et supplémentées en T4 pour l'expérimentation.

1.1.2.1. Premier essai pilote : brebis non thyroïdectomisées

Des prélèvements de sang ont été réalisés toutes les 30 minutes pendant 3 heures puis les 4 brebis ont reçu respectivement une administration intraveineuse de l'un des trois inhibiteurs potentiels retenus ou du solvant de l'acide méclofénamique.

Le furosémide (*Dimazon*ND, *Intervet*) a été administré à la dose de 10 mg/kg IV. Dans la littérature, la dose utilisée chez l'homme dans les études précédemment décrites⁽⁶⁵⁾ était de 500 mg *in toto*, soit une dose comprise entre 7 et 10 mg/kg.

La phénylbutazone (*Phénylarthrite*ND, *Vétoquinol*) a été administrée à la dose de 20 mg/kg IV. Cette dose est proche de celle recommandée pour le chien et le cheval. La dose utilisée dans les études précédemment décrites⁽⁴⁶⁾ était de 40 mg/kg chez le cheval.

L'acide méclofénamique (*Sigma*ND, solution à 44 mg/mL dans un mélange éthanol : sérum physiologique, 1 : 5, V : V) a été administré à la dose de 4 mg/kg IV. La dose utilisée chez l'homme, dans les études précédemment décrites^(14, 59), était de 100 mg *in toto* pour l'homme.

Après l'administration de l'inhibiteur ou du solvant, des prélèvements de sang ont été réalisés aux temps 5, 10, 20, 30, 45 et 60 minutes, puis toutes les heures, jusqu'à 6 heures après l'administration de l'inhibiteur ou du solvant et au temps 24 heures après l'administration.

Un schéma récapitulatif des manipulations réalisées est donné par la figure 6.

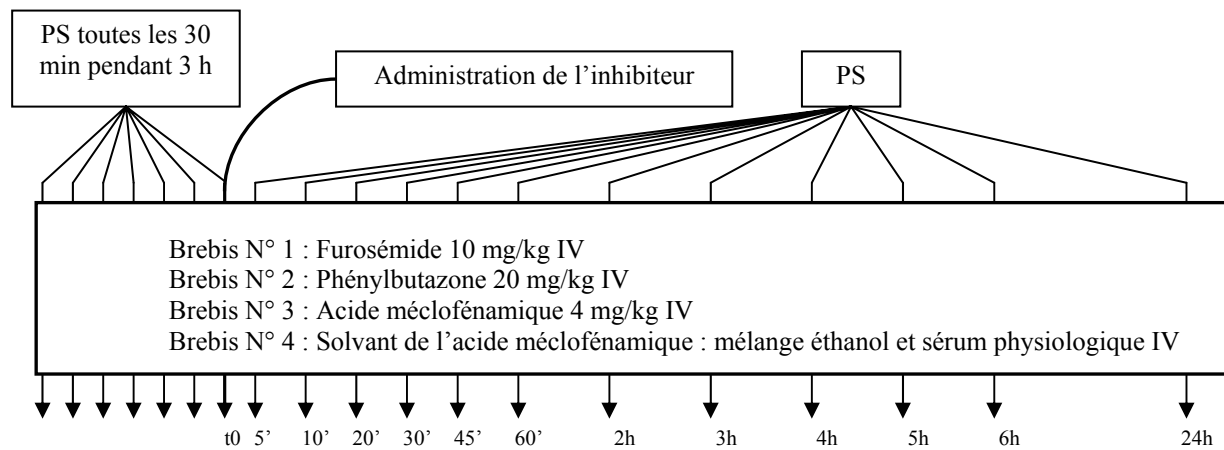


Figure 6 : Protocole expérimental de l'essai pilote n°1. PS = Prélèvement sanguin.

1.1.2.2. Deuxième essai pilote : brebis thyroïdectomisées

Les deux brebis thyroïdectomisées ont été supplémentées en T4 avec une dose quotidienne de 3 µg/kg administrée par voie sous cutanée pendant les 5 jours précédant l'essai.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés aux temps 5, 10, 20, 30 minutes après la cinquième administration de T4 puis toutes les 30 minutes pendant 3 heures.

Les 2 brebis ont reçu ensuite une administration quotidienne intraveineuse de phénylbutazone (*Phénylarthrite*ND) à la dose de 20 mg/kg. Après l'administration de la phénylbutazone, des prélèvements de sang ont été réalisés aux temps 5, 10, 20, 30, 45 et 60 minutes, puis toutes les heures, jusqu'à 6 heures après l'administration et au temps 24 heures après l'administration de la phénylbutazone.

Un schéma récapitulatif du protocole expérimental est donné par la figure 7.

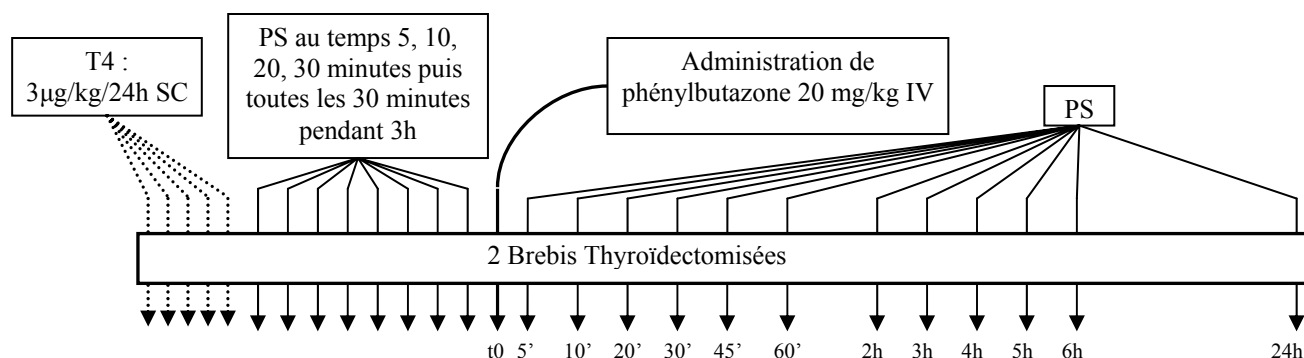


Figure 7 : Protocole expérimental de l'essai pilote n°2. PS = Prélèvement sanguin.

1.2. Résultats

1.2.1. Effets des inhibiteurs chez les brebis non thyroïdectomisées

La figure 8 représente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales et libres des brebis non thyroïdectomisées suite à l'administration de furosémide, de phénylbutazone ou d'acide méclofénamique.

La figure 9 représente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes (T3 totale, T3 libre et T4 libre), de la brebis non thyroïdectomisée ayant reçu l'administration du solvant de l'acide méclofénamique (mélange éthanol et sérum physiologique).

Une augmentation transitoire des concentrations plasmatiques en TT4 et FT4 a été observée immédiatement après chacune des administrations intraveineuses.

Les concentrations plasmatiques en TT3 ont été augmentées à la suite de l'administration d'acide méclofénamique, sont restées inchangées après l'administration de furosémide et ont été réduites de façon durable, après l'administration de phénylbutazone.

En ce qui concerne les concentrations de FT3, elles ont été transitoirement augmentées à la suite de l'administration de furosémide et d'acide méclofénamique et sensiblement réduites, suite à l'administration de phénylbutazone.

L'administration du solvant de l'acide méclofénamique a induit une augmentation transitoire des concentrations en T3 totale et en hormones thyroïdiennes libres.



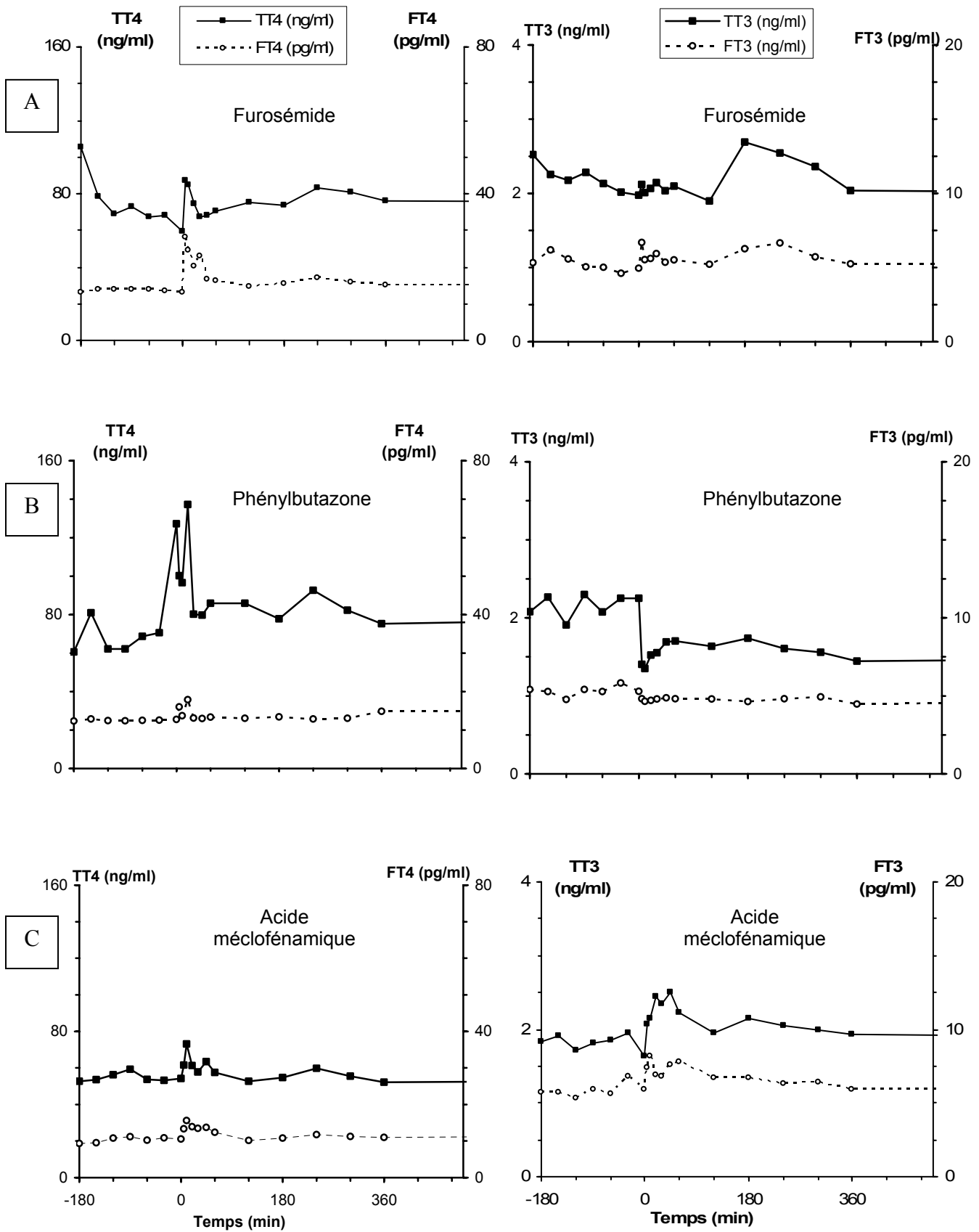


Figure 8 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes T4 et T3 libres (symbole rond ouvert) et totales (symbole carré plein) des 3 brebis qui ont reçu respectivement une administration intraveineuse de furosémide (A), de phénylbutazone (B) ou d'acide méclofénamique (C). L'aire ombrée représente la période qui suit l'administration.

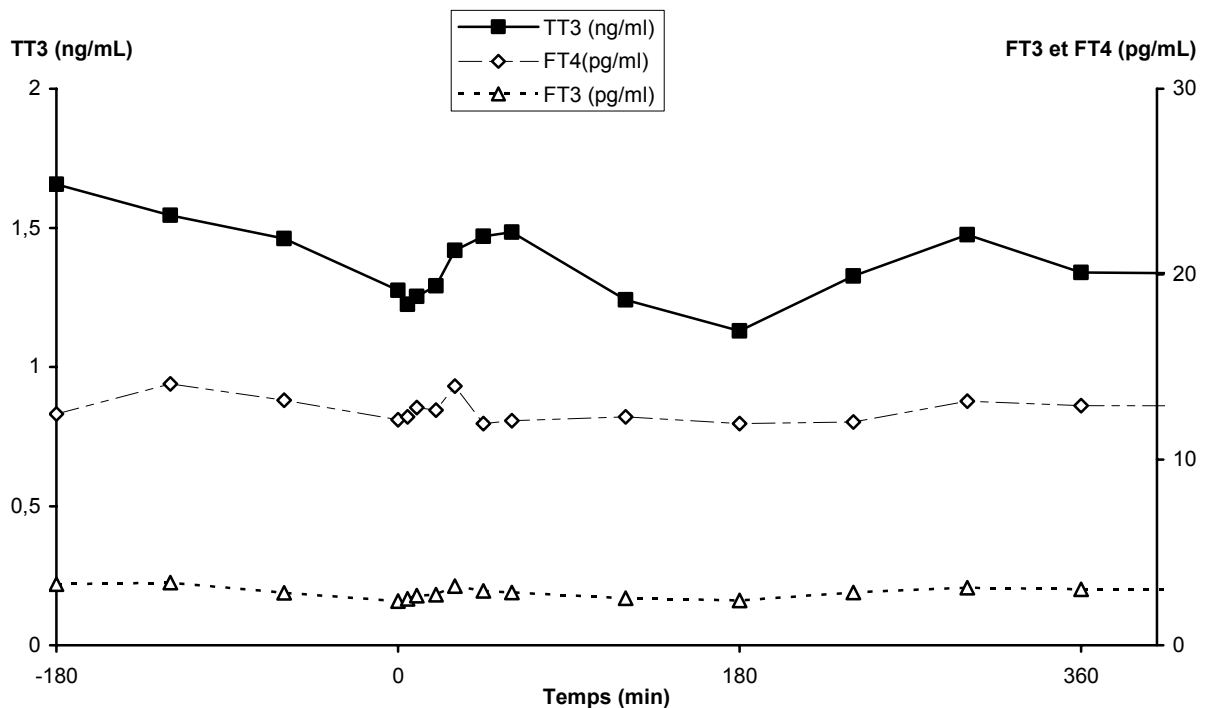


Figure 9 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en T4 libre (symbole losange ouvert), T3 totale (symbole carré plein) et T3 libre (symbole triangle ouvert) à la suite d'une administration intraveineuse du solvant de l'acide méclofénamique. L'aire ombrée représente la période qui suit l'administration.

1.2.2. Effets de la phénylbutazone chez les brebis thyroïdectomisées

La figure 10 représente l'effet de l'administration intraveineuse de phénylbutazone (*phénylarthrite*ND 20mg/kg) sur les concentrations plasmatiques (moyenne + écart type) de T4 et de T3 totales et libres des deux brebis thyroïdectomisées supplémentées en T4 par voie sous cutanée.

Nous remarquons que les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes avant l'administration de phénylbutazone étaient relativement stables.

A la suite de l'administration de phénylbutazone, une diminution durable des concentrations en T3 totale et une diminution transitoire des concentrations en T4 libre ont été observées. De plus, les concentrations en T3 libre qui étaient voisines de la limite de quantification du dosage, avant l'administration de l'inhibiteur, sont devenues inférieures après cette administration et ont retrouvé leurs valeurs initiales au cours de l'heure qui a suivi.

Une augmentation des concentrations en T4 totale sans modification durable des concentrations en T4 libre a été observée après l'administration de phénylbutazone.

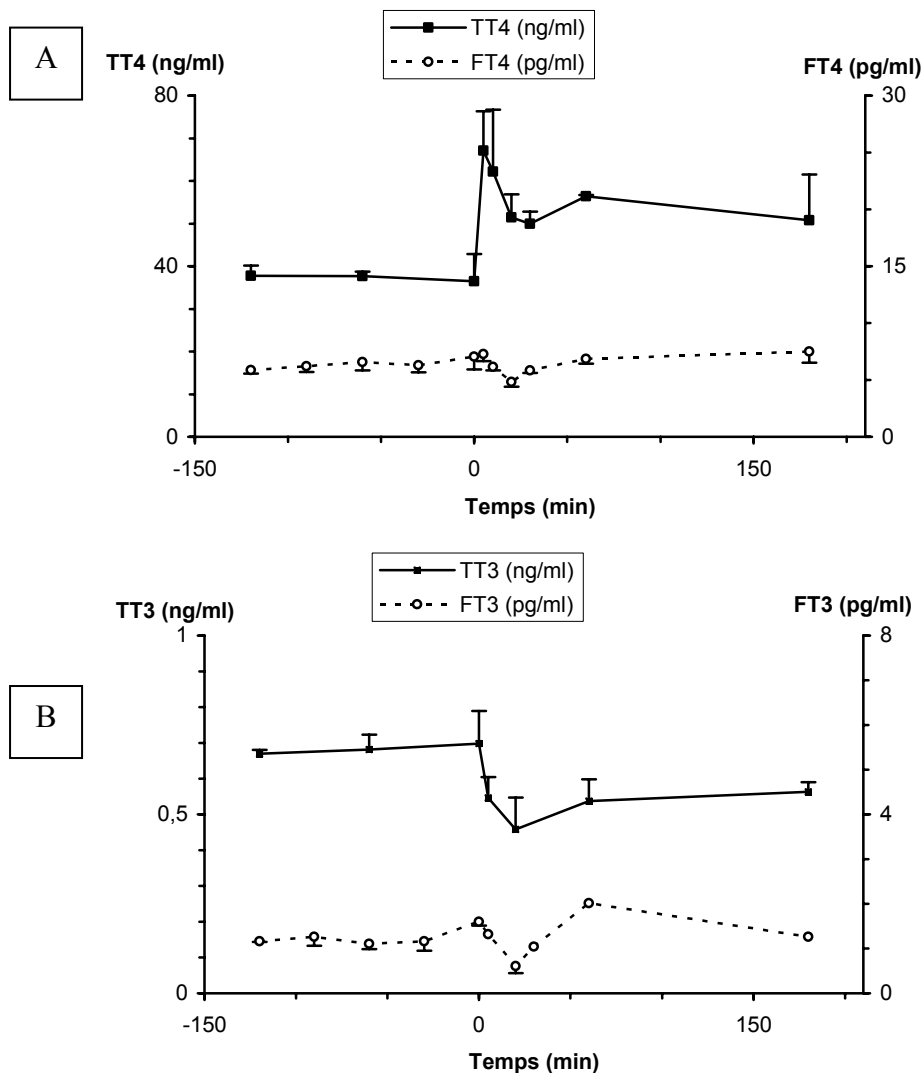


Figure 10: Effet de l'administration IV de la phénylbutazone (*Phénylarthrite*ND 20 mg/kg) sur les concentrations plasmatiques (moyenne + écart type) de T4 (A) et de T3 (B) totales et libres de deux brebis thyroïdectomisées supplémentées en T4 à la dose de 3 µg/kg/j par voie sous cutanée. L'aire ombrée représente la période qui suit l'administration de phénylbutazone.

1.3. Discussion

Le fait qu'une simple administration intraveineuse de solvant, chez les brebis non thyroïdectomisées, ait été suivie d'une augmentation des concentrations en hormones totales, suggère qu'une administration intraveineuse est capable d'augmenter la production ou la libération d'hormones thyroïdiennes. C'est un argument en faveur de l'utilisation de brebis thyroïdectomisées supplémentées en hormones thyroïdiennes, chez lesquelles le taux d'entrée des hormones est totalement maîtrisé.

Les variations des concentrations en T3 totale suite à l'administration de phénylbutazone chez la brebis non thyroïdectomisée et chez les brebis thyroïdectomisées supplémentées en T4 sont cohérentes avec notre hypothèse, puisque nous observons bien une diminution des concentrations en hormones totales.

En revanche, nous n'avons pas d'explication concernant l'augmentation importante et rapide de la concentration en T4 totale, chez les brebis thyroïdectomisées supplémentées en T4, suite à l'administration de phénylbutazone. Les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes étant contrôlées par leur biodisponibilité et leur clairance, il est possible que l'un de ces deux paramètres ait été modifiée. Une modification de la clairance est peu probable étant donnée la vitesse à laquelle l'augmentation des concentrations plasmatiques en T4 a été observée.

La diminution des concentrations plasmatiques en T3 totale observée chez les brebis thyroïdectomisées supplémentées en T4 suggère que la phénylbutazone, administrée à la dose de 20 mg/kg, déplace la T3 de ses sites de fixation aux protéines plasmatiques. C'est donc la phénylbutazone que nous avons retenue comme inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques.

Nous avons développé le modèle expérimental de brebis thyroïdectomisée supplémentée en hormones thyroïdiennes (T3 ou T4), afin de s'affranchir d'éventuelles fluctuations physiologiques des concentrations en hormones thyroïdiennes et de contrôler le taux d'entrée des hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine.

Une supplémentation en T4 par voie sous-cutanée semblait relativement efficace pour obtenir des concentrations stables au cours du temps. Cependant, la voie intraveineuse, via une perfusion continue, a été choisie préférentiellement à la voie sous-cutanée, afin d'éviter tout problème éventuel lié à des modifications de biodisponibilité par voie sous cutanée.

Les concentrations plasmatiques de T3, obtenues lors d'administration de T4 par voie sous cutanée seule, étaient sensiblement inférieures aux concentrations physiologiques. La désiodation périphérique de T4 en T3 ne serait donc pas suffisante pour maintenir les concentrations en T3 à un niveau physiologique chez les brebis thyroïdectomisées supplémentées en T4. De plus, dans le modèle « brebis thyroïdectomisée supplémentée en T4 », la possibilité de conversion de T4 en T3, au niveau du foie notamment, constitue un facteur de confusion propre à modifier les concentrations de T4.

C'est donc un modèle « brebis thyroïdectomisée supplémentée en T3 par voie intraveineuse » que nous avons privilégié pour étudier les effets de la phénylbutazone sur les

concentrations hormonales totales et libres. L'effet de cet inhibiteur compétitif chez la « brebis thyroïdectomisée supplémentée en T4 » sera analysé avec plus de précaution.

Le protocole de perfusion devra permettre d'atteindre des concentrations plasmatiques à l'équilibre, proches des valeurs physiologiques. Ce mode d'administration nous permettra également d'évaluer la clairance et le taux de production des hormones thyroïdiennes chez la brebis.

2. Approche *in vitro* : évaluation de la capacité de la phénylbutazone à déplacer les hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines plasmatique.

L'objectif de cette étude était de démontrer que la phénylbutazone est un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques. Dans le cadre de cette étude, nous avons également évalué les paramètres de liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques.

2.1. Protocole expérimental

Nous avons évalué *in vitro* la capacité de la phénylbutazone à déplacer la T3 de ses sites de liaison aux protéines plasmatiques via la détermination du pourcentage de T3 libre en l'absence et en présence de quantités croissantes de phénylbutazone par dialyse à l'équilibre (méthode de référence). L'effet de la phénylbutazone sur les concentrations en T3 libre a également été évalué par dosage radio-immunologique (RIA).

Cette approche nous a permis de déterminer les paramètres de liaison de la T3 aux protéines du plasma de brebis en l'absence et en présence de phénylbutazone à une concentration capable de déplacer la T3 de ses sites de liaison aux protéines plasmatiques.

Les mesures ont été réalisées à partir de plasma de brebis traité au charbon-dextran de façon à éliminer les hormones thyroïdiennes endogènes.

Essai n°1 : Evaluation *in vitro* de la capacité de la phénylbutazone à déplacer la T3 de ses sites de liaison aux protéines plasmatiques via la détermination de la fraction libre de T3 et des concentrations en T3 libre par 2 méthodes : la dialyse à l'équilibre couplée à l'utilisation de T3 radiomarquée et le dosage radio-immunologique de FT3 dans une solution plasmatique de T3 (5 ng/ml) en présence de quantités croissantes de phénylbutazone.

Le plasma de brebis traité au charbon-dextran a été surchargé en T3 à une concentration de 5 ng/ml. La phénylbutazone a été ajoutée à des fractions de plasma surchargé en T3 dans une gamme de concentrations de phénylbutazone allant de 0.5 ($1.6 \cdot 10^{-6}$ M) à 1000 µg/ml (2.10^{-6} M).

³M). Les solutions plasmatiques ont été conservées à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dialyses à l'équilibre ou du dosage radio-immunologique.

Essai n°2 : Détermination *in vitro* des paramètres de liaison de la T3 aux protéines du plasma de brebis par dialyse à l'équilibre couplée à l'utilisation de T3 radiomarquée en présence de phénylbutazone à une concentration capable de déplacer la T3 de ses sites de liaison. Le plasma traité au charbon-dextran a été surchargé en T3 dans une large gamme de concentrations allant de 0.5 à 10000 ng/ml (0.77 nM-15.4 µM). La phénylbutazone a été ajoutée à la concentration de 500 µg/ml (10⁻³M) à chacune des fractions de plasma surchargée en T3. Les solutions plasmatiques ont été conservées à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dialyses à l'équilibre.

2.2. Procédure expérimentale

2.2.1. Prélèvements sanguins et traitement des plasmas

Un volume de 500 mL de sang de brebis a été recueilli sur héparinate de lithium. Le plasma a été prélevé après centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes.

Les hormones thyroïdiennes endogènes ont été éliminées du plasma par adsorption sur du charbon (*Sigma*^R) en présence de dextran T70 (*Amersham Bioscience*) (1 g charbon et 100 mg de dextran T70 pour 10 mL de plasma). Le charbon-dextran a été lavé à deux reprises dans du sérum physiologique à la concentration de 1g de charbon/10 mL de sérum physiologique. Le surnageant a été éliminé après 4 cycles de centrifugations à 3000 g pendant 20 minutes. Un échantillon a été conservé à -20°C afin de s'assurer de l'absence de T3 dans les échantillons traités. Le plasma a été ensuite surchargé en T3 avec ou sans phénylbutazone.

2.2.2. Préparations des solutions plasmatiques de T3 avec ou sans phénylbutazone

La Triiodothyronine (*Sigma*^R) a été dissoute dans un mélange soude 1N:éthanol 95% (1:4, v:v) à la concentration de 10 mg/ml. Cette solution a été utilisée pour préparer 11 solutions de surcharge de T3 dans l'éthanol à des concentrations allant de 0.1 à 75 µg/mL. Ces solutions conservées à 4°C à l'abri de la lumière ont servi à la réalisation des surcharges du

plasma en T3 à la concentration de 5 ng/mL (essai n°1) ou dans une large gamme de concentrations allant de 0.5 à 10 000 ng/mL (essai n°2).

La phénylbutazone (*Sigma*^R) a été dissoute à la concentration de 100 mg/mL dans du DMSO. Cette solution a été utilisée pour préparer huit solutions de phénylbutazone dans du DMSO aux concentrations allant de 0.05 à 50mg/mL. Ces solutions ont servi à la réalisation des surcharges du plasma en phénylbutazone à des concentrations comprises entre 0.5 (1.6 10⁻⁶ M) et 1000 µg/ml (2.10⁻³M). Les concentrations en T3 totale et libre des solutions plasmatiques de l'essai n°1 ont été directement évaluées par dosage radio-immunologique.

2.2.3. Dialyse à l'équilibre

2.2.3.1. Procédure de dialyse à l'équilibre

Nous avons utilisé le système *Dianorm*^R (*CH8135, Langenau, Zurich*) qui utilise deux demi-cellules en téflon (*Diachema*^R 16-10, *Scientetec, ZA Courtaboeuf, Les Ulis*) séparées par une membrane semi-perméable en cellulose qui exclut le passage des substances de poids moléculaire supérieur à 10 000 Da (*Scientetec*).

Une solution de T3 marquée à l'iode 125 à 20 µCi /mL en solution dans un mélange éthanol:H₂O (3:1) (*Amersham Bioscience*, Radioactivité spécifique : 114 MBq/µg ou 3076 µCi/µg soit 6828 dpm/pg) a été utilisée comme traceur et ajoutée aux solutions plasmatiques de T3 de façon à ce que la radioactivité de la solution plasmatique soit de l'ordre de 44 400 000 dpm/mL, ce qui correspondait à une concentration en T3 radiomarquée de l'ordre de 0.064 ng/mL, négligeable devant les concentrations plasmatiques en T3 froide (0.5-10 000 ng/mL). Des volumes de 900 µL de plasma surchargé et de tampon de dialyse (Na₂HPO₄, 22.46 mM, NaH₂PO₄, 5.62mM et NaCl 95 mM) ont été introduits respectivement dans chacune des demi-cellules de dialyse. Celles-ci ont été placées pendant une heure dans un bain marie à la température de 37°C et soumises à une rotation constante de 20 rpm. A la fin de l'incubation, les solutions de plasma et de tampon dialysés ont été prélevées.

2.2.3.2. Traitement des solutions de plasma et de tampon dialysés

2.2.3.2.1. Essais préliminaires de précipitation de la T3

La méthode de dialyse à l'équilibre se heurte à une difficulté méthodologique liée à la faible importance de la fraction libre des hormones thyroïdiennes (de l'ordre de 0.2% pour T3). Le dialysat est inévitablement contaminé par une quantité de radioactivité portée par les résidus d'iode radioactif (radiolyse) qui excède la quantité de radioactivité portée par l'hormone. Afin d'évaluer la quantité de radioactivité du dialysat portée par T3, nous avons adapté la méthode développée par Sterling et Brenner ⁽⁶²⁾ pour précipiter la T3 radiomarquée des dialysats avec des sels de magnésium. Dans une étape préliminaire de mise au point de la méthode, nous avons réalisé 2 solutions de T3 radiomarquée à 2 niveaux de dilution dans du tampon de dialyse et nous avons compté la radioactivité de ces solutions avant et après précipitation de la T3. Dans un premier temps, nous avons comparé les rendements de la précipitation en présence de T3 ou de T4 froide en excès. Le tableau 5 donne les quantités de radioactivité de 2 solutions de T3 radiomarquée avant précipitation (radioactivité totale), dans les 4 surnageants issus respectivement de la première centrifugation et des 3 lavages et dans le culot en présence de T3 ou de T4 en excès ; la vitesse et la durée de centrifugation étaient respectivement de 20 000g et de 60 minutes. Le rendement de la précipitation a été amélioré par l'utilisation de T4 froide en excès. Dans un deuxième temps, nous avons comparé 2 durées de centrifugation : 30 et 60 minutes à 20000g en présence de T4 en excès. Le tableau 6 donne les quantités de radioactivité d'une solution de T3 radiomarquée avant précipitation (radioactivité totale), dans les 4 surnageants et dans le culot en présence de T4 en excès pour 2 durées de centrifugation : 30 et 60 minutes à 20 000 g. Nous avons montré que le rendement de la méthode n'était pas amélioré par l'augmentation de la durée de centrifugation. La méthode adaptée a un rendement de l'ordre de l'ordre de 85% ; ce rendement est cohérent avec la pureté radiochimique de l'hormone radiomarquée garantie par *Amersham Bioscience* (90%).

Précipitation	Radioactivité initiale	S1	S 2	S 3	S 4	Culot	Récupération (%)
Excès T3	961	186	176	185	160	310	32.3
Excès T3	961	114	198	193	130	397	41.3
Excès T4	961	56	47	51	52	751	78.1
Excès T4	961	59	53	53	46	620	64.5
Excès T3	461	67	89	94	94	183	39.7
Excès T3	461	102	123	88	74	186	40.3
Excès T4	461	49	46	45	39	395	85.7
Excès T4	461	49	47	48	40	391	84.8

Tableau 5 : Quantités de radioactivité de 2 solutions de T3 radiomarquée avant précipitation (radioactivité totale), dans les 4 surnageants (S1-S4) issus respectivement de la première centrifugation et des 3 lavages et dans le culot en présence de T3 ou de T4 en excès ; la vitesse et la durée de centrifugation étaient respectivement de 20000g et d'une heure (le bruit de fond de la méthode est de l'ordre de 40). La dernière colonne indique le pourcentage de récupération de la radioactivité totale dans le culot.

Durée centrifugation	Radioactivité initiale	S1	S 2	S 3	S 4	Culot	Récupération (%)
60 min	2556	94	64	75	77	2115	82.7
60 min	2556	94	66	75	68	2272	87.1
30 min	2556	80	69	72	77	1950	76.3
30 min	2556	94	60	109	76	2148	84.0

Tableau 6 : Quantités de radioactivité d'une solution de T3 radiomarquée avant précipitation (radioactivité totale), dans les 4 surnageants (S1-S4) et dans le culot en présence de T4 en excès pour 2 durées de centrifugation : 30 minutes et une heure à 20 000 g. La dernière colonne indique le pourcentage de récupération de la radioactivité totale dans le culot.

2.2.3.2.2. Méthode de précipitation de la T3

Cinq cent μL de tampon dialysé ont été pipetés dans un tube dans lequel ont été ajoutés 340 μL de la solution à 1mg/mL de thyroxine dans NaOH 0.033N (solution stokée à 4°C à l'abri de la lumière). Le tube a été vortexé brièvement. Après addition de 165 μL d'une solution de magnésium chloride précipitante ($\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ à 10% dans du Tris sodium chloride, pH 9.3), un précipité blanc dense est formé. Le tube a été à nouveau agité au vortex. Après centrifugation (30 minutes à 20 000 g) et décantation du surnageant clair, le culot a été lavé 3 fois avec 670 μL de solution de lavage de magnésium chloride.

La radioactivité du tampon dialysé non précipité (200 μL), du tampon dialysé précipité (à partir de 500 μL) et du plasma dialysé (500 μL) a été comptée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (*Kontron Beta V, Montigny Le Bretonneux, France*) après addition de 4.5 mL de liquide scintillant (*Ready SafeR, Beckman Instruments, Gagny*). Les coups par minute ont été convertis en désintégrations par minute.

La détermination du nombre de dpm à l'équilibre dans chacun des compartiments (plasma/tampon dialysés) a permis de calculer les concentrations totales et les concentrations en T3 libre à l'équilibre à partir des équations suivantes.

$$P_E = P_T \times \frac{\text{dpm plasma}}{\text{dpm tampon} + \text{dpm plasma}}$$

$$F = P_E \times \frac{\text{dpm tampon}}{\text{dpm plasma}}$$

$$B = P_E - F$$

Où P_T est la concentration initiale de T3 dans le plasma

P_E est la concentration de T3 dans le plasma à l'équilibre

F et B sont les concentrations des formes libres et liées de T3 à l'équilibre.

2.2.3.3. Analyse des données

La dialyse à l'équilibre couplée à l'utilisation de T3 radiomarquée et le dosage direct de T3 totale et libre des solutions plasmatiques de l'essai n°1 ont permis d'obtenir des couples de valeurs de concentrations en T3 libre et liée aux protéines plasmatiques. A partir du dosage direct des solutions plasmatiques, les concentrations en T3 liée aux protéines plasmatiques ont été estimées en faisant la différence entre les valeurs des concentrations en T3 totale et en T3 libre.

Les concentrations en T3 liée aux protéines plasmatiques ont été représentées graphiquement en fonction des concentrations en T3 libre. Les données ont été ajustées à l'aide de l'équation suivante (Cf. Chapitre 1 2.2. Les paramètres de liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques).

$$B = \frac{B_{\max} \cdot F}{K_d + F} + NS \cdot F$$

où B est la concentration en hormone liée aux protéines plasmatiques

B_{\max} est la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG

K_d est la constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3

F est la concentration en T3 libre

NS est la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine.

Les paramètres (B_{\max} , K_d , NS) ont été évalués par régression non linéaire à l'aide du logiciel Winnonlin^R.

2.3. Résultats

Essai n°1 : Evaluation *in vitro* de la capacité de la phénylbutazone à déplacer la T3 de ses sites de liaison aux protéines plasmatiques via la détermination de la fraction libre de T3 et des concentrations en T3 libre par 2 méthodes : la dialyse à l'équilibre couplée à l'utilisation de T3 radiomarquée et le dosage radio-immunologique d'une solution plasmatique de T3 totale (5 ng/mL) en présence de quantités croissantes de phénylbutazone.

La figure 11 donne le pourcentage de T3 libre, obtenu par dialyse à l'équilibre, en fonction de la concentration plasmatique en phénylbutazone. Ce pourcentage est resté stable pour des concentrations plasmatiques en phénylbutazone inférieures ou égales à 200 µg/mL, il a augmenté ensuite proportionnellement à la concentration en T3 libre et a été multiplié par un facteur 3 pour la concentration maximale en phénylbutazone de 1000 µg/mL.

Le tableau 7 donne les concentrations plasmatiques en T3 totale et libre évaluées par dosage radio-immunologique en l'absence et en présence de concentrations plasmatiques croissantes en phénylbutazone. Les concentrations plasmatiques en T3 totale et libre n'ont pas varié quelle que soit la concentration en phénylbutazone.

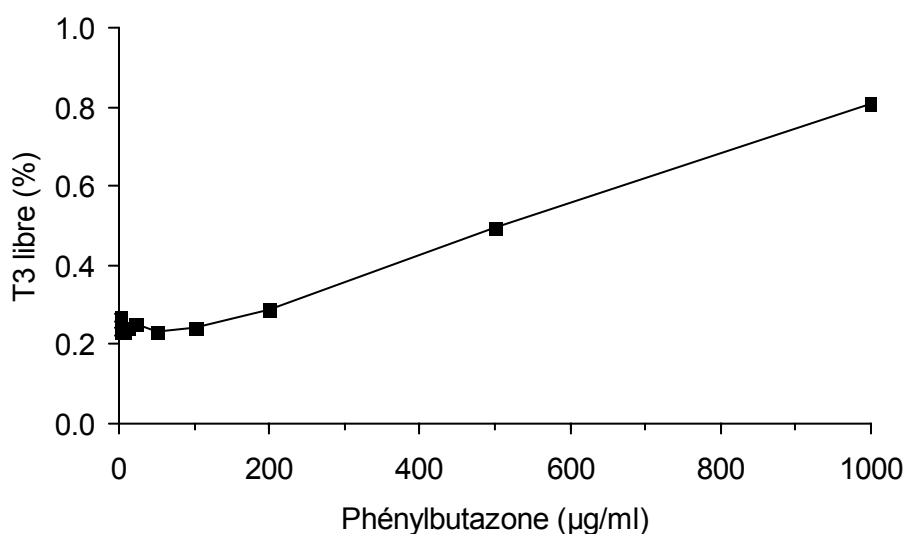


Figure 11 : Effet de l'addition de phénylbutazone dans le plasma de brebis surchargé en T3 à la concentration totale de 5 ng/mL sur le pourcentage de T3 libre évalué par dialyse à l'équilibre.

Phénylbutazone ($\mu\text{g/mL}$)	T3 totale (ng/mL)	T3 libre (pg/mL)
0	4.6	7.1
0.05	4.2	6.8
0.5	4.5	7.0
5	4.5	6.7
10	4.0	6.4
20	4.1	7.3
50	4.4	6.7
100	3.9	6.4
200	3.8	7.9
500	3.9	7.4
1000	4.9	5.9

Tableau 7 : Concentrations plasmatiques en T3 totale et libre évaluées par dosage radio-immunologique en l'absence et en présence de concentrations plasmatiques croissantes en phénylbutazone.

Essai n°2 : Détermination *in vitro* des paramètres de liaison de la T3 aux protéines du plasma de brebis par dialyse à l'équilibre couplée à l'utilisation de T3 radiomarquée en présence de phénylbutazone à une concentration capable de déplacer la T3 de ses sites de liaison.

La figure 12 illustre l'évolution des concentrations plasmatiques en T3 liée aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations en T3 libre en l'absence et en présence de phénylbutazone à la concentration de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Les paramètres de liaison de T3 aux protéines plasmatiques ont été évalués en l'absence ou en présence de phénylbutazone à la concentration de 500 $\mu\text{g/mL}$ par régression non linéaire. La capacité maximale de liaison de la T3 à la TBG (B_{max}), la constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3 (K_d) et la constante de liaison non spécifique (NS) ont été respectivement estimés à 149.4 ng/mL (230 nM), 0.39 ng/mL (0.60 nM) et 199.5, en l'absence de phénylbutazone. Seule la valeur de NS a pu être évaluée avec précision en présence de phénylbutazone à 133.

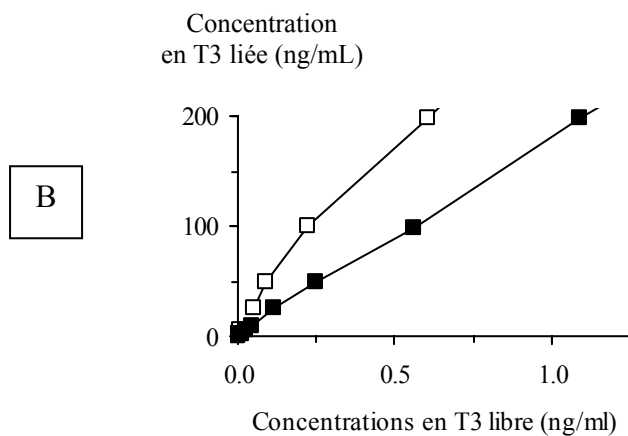
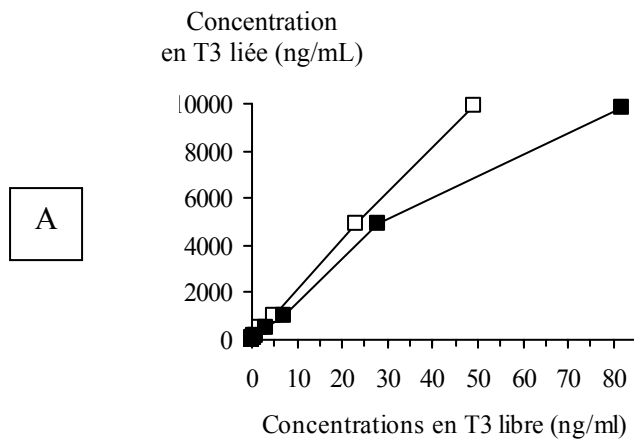


Figure 12 : Evolution des concentrations plasmatiques en T3 liée aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations en T3 libre en l'absence (symboles ouverts) et en présence de phénylbutazone à la concentration de 500 µg/mL (symboles fermés)

A. Gamme de concentration en T3 allant de 0.5 à 10000 ng/mL.

B. Gamme de concentration en T3 allant de 0.5 à 200 ng/mL.

2.4. Discussion

La technique de référence de la dialyse à l'équilibre couplée à l'utilisation de T3 radiomarquée nous a permis de montrer que la phénylbutazone est capable de déplacer la T3 de ses sites de liaison aux protéines plasmatiques. En effet, nous avons montré que l'addition de quantités croissantes de phénylbutazone au plasma surchargé en T3 à une valeur de concentration physiologique entraîne une augmentation de la fraction libre de T3. Il en résulte une augmentation des concentrations en T3 libre, cohérente avec notre hypothèse de

départ. L'absence d'augmentation des concentrations en T3 libre évaluées par dosage radio-immunologique soulève la question de la validité de cette approche en présence d'une concentration élevée de phénylbutazone.

Nous avons évalué les paramètres de liaison de la T3 aux protéines plasmatiques. Les valeurs de la capacité maximale de liaison de la T3 et de la constante de liaison non spécifique de la T3 à la TBG ont été estimées respectivement à 230 nM et 0.60 nM. La valeur de la capacité maximale de liaison de la T3 à la TBG est du même ordre de grandeur que celle précédemment décrite pour la T4 chez les ovins par Sutherland ⁽⁶⁶⁾ en 1975 ($B_{max}=165nM$). La constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3 est supérieure à celle décrite par Sutherland pour la T4 (0.11nM), ce qui est cohérent avec l'affinité inférieure de la TBG pour la T3 en comparaison avec son affinité pour la T4. En l'absence de phénylbutazone, les concentrations de T3 liée aux protéines plasmatiques ont augmenté proportionnellement aux concentrations en T3 libre au-delà d'une concentration en T3 totale de l'ordre de 200 ng/mL (B_{max}), ce qui traduit la saturation de la capacité de liaison de la TBG.

En présence de phénylbutazone, nous n'avons pas pu évaluer les paramètres de liaison de T3 à la TBG et déterminer la nature de la protéine plasmatique avec laquelle la phénylbutazone interagit principalement. Dans cette condition expérimentale, nous avons observé des modifications de la courbe de saturation des protéines plasmatiques qui a présenté 2 pentes. La première pente correspondant à la fixation de la T3 pour des concentrations en T3 inférieures à 5000 ng/mL (7680nM), valeur d'une même ordre de grandeur que la capacité maximale de liaison de la transthyrétine (4621 nM) selon Sutherland ⁽⁶⁶⁾. La première partie linéaire de la courbe de saturation suggère une augmentation de la constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3, cohérente avec la compétition de la phénylbutazone avec les sites de liaison de la TBG. La diminution de la constante de liaison non spécifique de la T3 alliée à la modification de la courbe de saturation suggère que la phénylbutazone est également un compétiteur de la liaison de la T3 à la transthyrétine comme cela a été décrit dans la littérature ^(46, 56).

3. Approche *in vivo* : effet de l'administration phénylbutazone à des brebis thyroïdectomisées et supplémentées en hormones thyroïdiennes sur les concentrations hormonales plasmatiques

L'objectif était d'évaluer, dans les conditions *in vivo*, les variations des concentrations plasmatiques en T3 (T4) totale et libre, observées après le déplacement de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques par la phénylbutazone.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Animaux

L'étude a été réalisée avec 6 brebis de race Lacaune, pubères, en période d'anœstrus, âgées de 10 mois et de poids moyen 43.7 (\pm 2.7) kg. Elles ont été placées dans les cages individuelles, une semaine avant le début des expériences. Elles ont reçu un régime alimentaire à base de foin *ad libitum*.

3.1.2. Protocole expérimental

3.1.2.1. Profil nyctéméral des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes

Des prélèvements de sang ont été réalisés toutes les heures pendant 24 h sur les brebis avant thyroïdectomie, afin d'évaluer les profils nyctéméraux des concentrations plasmatiques en T3 et T4 totales et libres. Un volume de 5 mL de sang a été recueilli toutes les 2 heures dans des tubes en polypropylène contenant de l'héparinate de lithium.

3.1.2.2. Profil de décroissance des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes après la thyroïdectomie

Les brebis ont été thyroïdectomisées. Après la thyroïdectomie, la cinétique de décroissance des hormones thyroïdiennes totales et libres a été évaluée. Deux prélèvements sanguins de contrôle ont été réalisés à un intervalle de 20 minutes et ont débuté 40 minutes avant l'induction de l'anesthésie. Par la suite, les prélèvements sanguins ont été réalisés aux temps 30 min et 60 min après l'induction de l'anesthésie et aux temps 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après la thyroïdectomie puis toutes les heures jusqu'à 12 heures et toutes les 24 heures pendant 7 jours et enfin, toutes les 48 heures pendant 40 jours.

3.1.2.3. Etude de compétition *in vivo*

Cette étude a comporté deux périodes séparées de 25 jours. Au cours de la première période, les brebis thyroïdectomisées ont reçu une administration IV de T3 à la dose de 1.32 µg/mL suivie d'une perfusion IV de T3 au taux de 4.15 µg/h pendant 8 jours. Au cours de la deuxième période, elles ont reçu une administration de T4 à la dose de 2.8 µg/mL suivie d'une perfusion IV de T4 au taux de 3.2 µg/h pendant 8 jours. Les doses de T3 et T4 précédemment citées ont été choisies dans le but d'obtenir des concentrations plasmatiques à l'équilibre proches des valeurs physiologiques.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les heures pendant 4 heures suivant l'administration IV de T3 ou T4, puis 2 ou 4 fois par jour au cours des 48 heures suivantes (à 10h00, 13h00, 16h00 et 19h00).

Trois jours après le début des perfusions, des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 20 minutes pendant 4 heures, de façon à évaluer les concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre de T3 et T4. Ces données ont été utilisées pour estimer la clairance de T3 et T4. Les brebis ont ensuite reçu une administration intraveineuse d'un volume de l'excipient de la *Phénylarthrite*ND équivalent au volume de *Phénylarthrite*ND à administrer pour obtenir une dose de 20 mg/kg. Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 10 minutes pendant la première heure puis au temps 2h après l'administration de l'excipient. Les brebis ont ensuite reçu une administration intraveineuse de phénylbutazone (*Phénylarthrite*ND) à la dose de 20 mg/kg. Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 10 minutes pendant la première heure, puis toutes les heures pendant 6 heures et enfin tous les jours pendant 5 jours après l'administration de phénylbutazone.

Un schéma du protocole expérimental est donné par la figure 13.

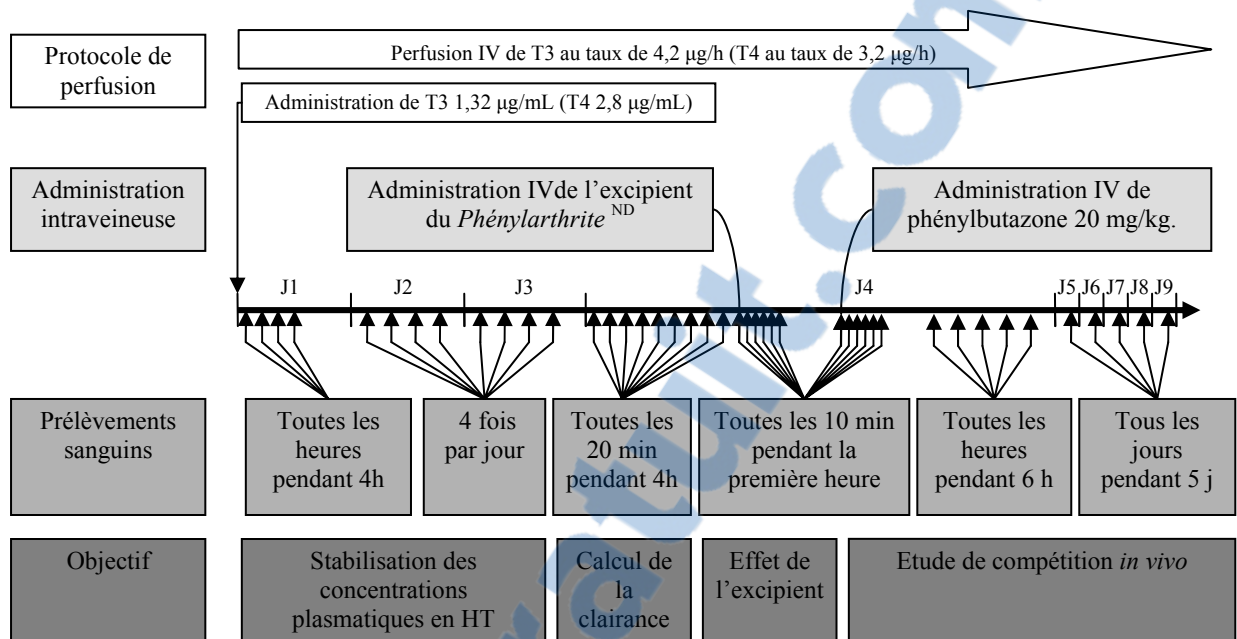


Figure 13 : Protocole expérimental de l'étude de l'effet de la phénylbutazone sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes.

3.1.3. Procédure expérimentale

3.1.3.1. Thyroïdectomie

Les brebis, mises à jeun pendant 24h, ont été préalablement pesées et largement tondues dans la région du cou.

Elles ont été anesthésiées par l'administration intraveineuse de thiopental (*Nesdonal*ND) à la dose de 20 mg/kg. Une intubation endo-trachéale a été réalisée à la suite de l'induction puis, le relais a été pris avec un anesthésiant gazeux (Isoflurane 1.5% + O₂).

Les brebis ont été installées en décubitus dorsal sur une table chirurgicale, l'encolure a été maintenue en extension. La région opératoire a été lavée avec une solution savonneuse d'iode (*Vétidine savon*ND) puis désinfectée avec de l'alcool 70° et une solution iodée (*Vétidine solution*ND).

La peau a été incisée sur 10 cm en arrière du larynx parallèlement à la trachée à l'aide d'un bistouri. L'hémostase a été réalisée à l'aide d'un bistouri électrique. Le tissu conjonctif sous cutané a été disséqué et la trachée a été exposée en réclinant les muscles sternaux thyroïdiens

et sternaux hyoïdiens jusqu'à la visualisation de l'isthme connectif reliant les deux lobes de la thyroïde. L'isthme connectif a été dissocié de la face ventrale de la trachée et coupé en 2 médialement sur la trachée. Les deux lobes situés de chaque côté du larynx ont été disséqués indépendamment à partir de l'isthme et dissociés du tissu sous-jacent. Les vaisseaux sanguins ont été ligaturés le plus loin possible de la glande à l'aide de fil résorbable. Une attention toute particulière a été observée à la préservation du nerf laryngé récurrent. La suture a été réalisée avec un surjet sous cutané résorbable et avec des points cutanés en croix.

Nous avons surveillé l'éventuelle apparition de collections oedémateuses, d'hématomes, de signes témoignant d'une hypocalcémie ou d'une lésion du nerf laryngé récurrent (troubles de la déglutition, toux, dyspnée).

La couverture antibiotique a été réalisée avec de l'amoxicilline (*Clamoxyl LA*ND) à la dose de 15 mg/kg/48h pendant 4 jours.

En cas d'apparition de signes d'hypocalcémie, une perfusion lente par voie veineuse de 100mL d'un soluté phosphocalcique tiédi, (*Bioveine Gluconate de Calcium*ND) aurait été réalisée, suivie d'un relai par l'injection SC de 100 mL de cette même solution puis par l'ingestion quotidienne de 150 mL d'une suspension orale concentrée en calcium et phosphore (*Calform phosphore*ND).

3.1.3.2. Prélèvements sanguins, traitement des échantillons

Les prélèvements sanguins, la supplémentation en hormones thyroïdiennes et l'administration de phénylbutazone ont été effectués à l'aide de 2 cathéters (hémocath 30, *Vygon*ND, Paris diamètre 30mm diamètre extérieur 1.5 mm) placés respectivement dans les veines jugulaires gauche et droite. Les cathéters ont été rincés avec 1mL de sérum physiologique après chaque prélèvement.

Cinq millilitres de sang ont été recueillis à chaque prélèvement, dans des tubes en polypropylène contenant de l'héparinate de lithium. Les tubes ont été centrifugés à 3000 g et le sang a été réparti en trois fractions de 750 µL conservées à une température inférieure à -20°C.

3.1.3.3. Supplémentation et administration

Les administrations intraveineuses de T3 et T4 ont été réalisées dans la veine jugulaire droite. T3 et T4 (Sigma R) ont été dissoutes dans un mélange de soude 1N:éthanol 95% (1:4, V:V) à la concentration de 3 mg/mL. Ces solutions ont été conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

La T3 (T4) a été administrée à la dose de 1.32 µg/kg (2.8 µg/kg) à partir d'une solution préparée extemporanément à la concentration de 30 µg/mL dans du tampon phosphate 10mM salé contenant de la BSA (0.1%). Une solution de T3 (T4) à la concentration de 4.2 µg/kg (3.2 µg/kg) dans du tampon phosphaté 10mM salé, contenant de la BSA (0.1%), a été perfusée au débit de 1mL/h (4.15 µg/h pour T3 et 3.2 µg/h pour T4) pendant 8 jours en utilisant le cathéter de la veine jugulaire droite.

La phénylbutazone (*Phénylarthite*ND) a été administrée par voie intraveineuse dans la veine jugulaire gauche à la dose de 20 mg/kg.

3.1.3.4. Méthodes analytiques

Les concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres (TT4, FT4, TT3 et FT3) ont été évaluées par dosage radio-immunologique (RIA kit DPC) utilisant des traceurs marqués à l'iode 125 (kit T3total et T3 free DPC coat-A-Count).

3.1.3.5. Détermination de la clairance et du taux de production des hormones thyroïdiennes

La clairance des hormones thyroïdiennes a été calculée à partir de l'équation 24 :

$$Cl = \frac{\tau}{C_{SS}} \quad (\text{équation 24})$$

Où τ est le taux de perfusion des hormones thyroïdiennes en ng/kg/h.

C_{SS} est la concentration plasmatique à l'équilibre en hormones thyroïdiennes en ng/mL mesurée en faisant la moyenne des concentrations plasmatiques obtenues au cours des 4 h précédant l'administration de phénylbutazone.

Les taux de production de T3 et T4 ont été calculés à partir des valeurs de clairance estimées à partir de l'équation 24 et des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes évaluées, chez des brebis non thyroïdectomisées, au cours d'un nycthémère :

$$TE_{24h} = Cl \times AUC_{0-24h} \quad (\text{équation 25})$$

Où TE est le taux de production en hormones thyroïdiennes pendant 24h.

Cl est la clairance (mL/(kg.h)) des hormones thyroïdiennes.

AUC_{0-24h} correspond à l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales calculées de t=0 à t=24h.

3.1.3.6. Analyses statistiques des données

Les données concernant les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes totales et libres ont été analysées avec le logiciel *Systat*ND (*Systat 10, Systat Software Inc., Richmond, California, USA*).

L'effet de la phénylbutazone sur les concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres a été analysé à l'aide du modèle d'analyse de variance suivant :

$$Y_{i,j,k} = \mu + B_i + I_j + T_k + \varepsilon_{i,j,k}$$

Où $Y_{i,j,k}$ est la réponse observée pour la brebis i , du traitement j , au temps k .

μ est l'effet moyen général.

B_i est l'effet de la brebis i .

I_j est l'effet du traitement (avant vs après administration de phénylbutazone).

T_k est l'effet du temps k .

$\varepsilon_{i,j,k}$ est le terme d'erreur du modèle.

3.2. Résultats

3.2.1. Profil nycthéral des concentrations en hormones thyroïdiennes

La figure 14 représente les variations nycthérales des concentrations plasmatiques moyennes (\pm écart-type) en T3 et T4 totale et libre.

Le tableau 8 présente les valeurs moyennes globales (\pm écart-type) des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes.

Les concentrations moyennes globales en T3 totale et libre ont été respectivement 1.39 ± 0.35 ng/mL et 2.20 ± 0.70 pg/mL. La fraction libre de T3 a représenté 0.16% de la T3 plasmatique totale. Les concentrations moyennes globales en T4 totale et libre ont été respectivement de 84.8 ± 20.1 ng/mL et 16.0 ± 4.17 pg/mL. La fraction libre de T4 représentait 0.02% de la T4 plasmatique totale.

	Totale	Libre	Pourcentage d'hormones libres
T3	1.39 ± 0.35 ng/mL	2.20 ± 0.70 pg/mL	0.16%
T4	84.8 ± 20.1 ng/mL	16.0 ± 4.17 pg/mL	0.02%

Tableau 8 : Concentrations moyennes globales (\pm écart-type) en T3 totale et libre et T4 totale et libre et pourcentage d'hormones libres (n=6 brebis).

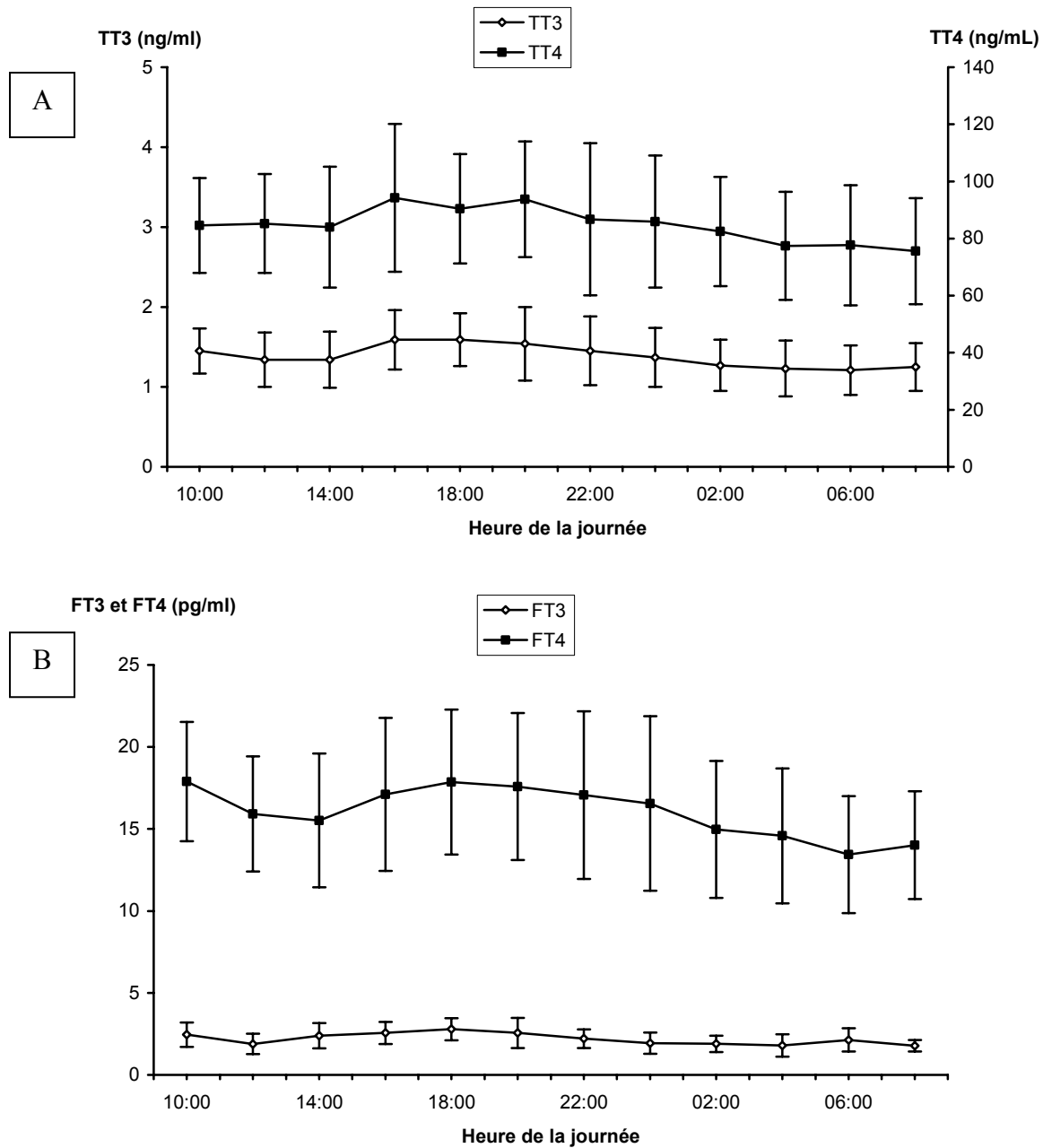


Figure 14 : Evolution au cours du nyctémères des concentrations plasmatiques moyennes (\pm écart-type) de T3 totale (TT3), T4 totale (TT4) (graphique A) et de T3 libre (FT3) et T4 libre (FT4) (graphique B) (n=6 brebis). Les prélèvements ont été effectués toutes les 2 h pendant 24 heures.

3.2.2. Clairance et taux de production des hormones thyroïdiennes

La clairance de la T3 totale a été estimée à 35.6 ± 4.22 mL/(kg.h) celle de la T3 libre à 20059 ± 4111 mL/(kg.h). La clairance de la T4 totale a été estimée à 2.17 ± 0.33 mL/(kg.h), celle de la T4 libre à 12027 ± 2662 mL/(kg.h). Les taux de production de T3 et de T4 ont été évalués à 44.7 ng/(kg.h) et 256 ng/(kg.h) respectivement.

3.2.3. Profil de décroissance des concentrations en hormones thyroïdiennes après la thyroïdectomie

Sept jours après la thyroïdectomie, les concentrations plasmatiques en T4 totales sont devenues inférieures à la limite de quantification du dosage de T4 totale, soit 5 ng/mL. Au même moment, les concentrations plasmatiques en T3 totale de toutes les brebis sauf une étaient inférieures à la limite de quantification du dosage de T3 totale, soit 0.5 ng/mL. Six jours après la thyroïdectomie, les concentrations plasmatiques en T3 et T4 libre étaient toutes inférieures à la limite de quantification du dosage, soit 0.54 pg/mL pour T3 et 0.9 pg/mL pour T4. La figure 15 illustre la cinétique temporelle de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes en T3 et T4 totales et libres après la thyroïdectomie.

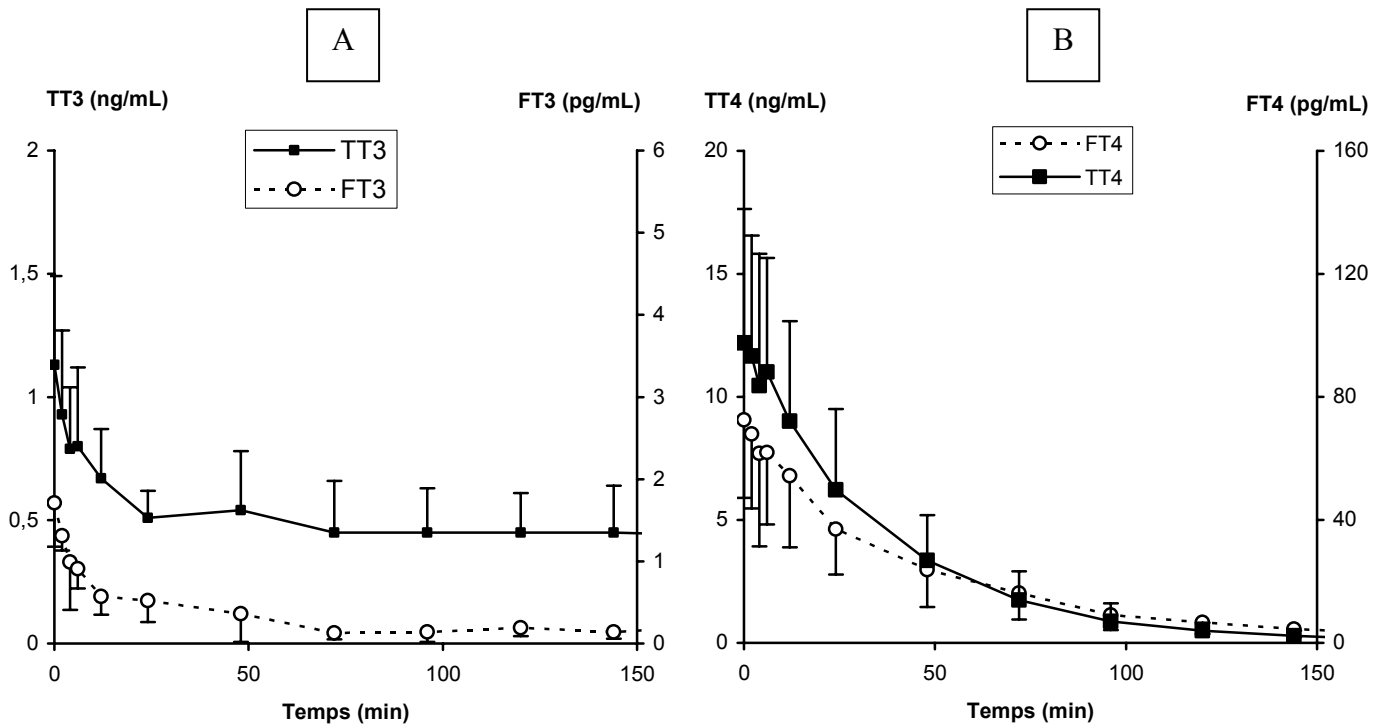


Figure 15.: Cinétique temporelle de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes \pm écart-type (n=6) de T3 (A) et T4 (B) totales et libres après la thyroïdectomie.

3.2.4. Etude de compétition *in vivo*

Les concentrations plasmatiques moyennes de T3 et T4 totales et libres, avant et après l'administration de la phénylbutazone, sont illustrées par la figure 16. Le tableau 9 représente les valeurs moyennes globales (\pm écart-type) des concentrations plasmatiques en T3 totale, T3 libre, T4 totale et T4 libre, 4h avant, 1h après et 6h après l'administration de phénylbutazone. Les valeurs moyennes globales (\pm écart-type) sont également représentées graphiquement par la figure 17.

Nous remarquons que l'administration de l'excipient du *Phénylarthrite*ND n'engendre pas de modification des concentrations hormonales plasmatiques.

En revanche, la concentration plasmatique moyenne de T3 totale a varié de 2.71 ± 0.49 ng/mL (concentration de base) à une valeur moyenne de 1.64 ± 0.29 ng/mL, 1 heure après l'administration de phénylbutazone, ce qui correspond à une diminution significative ($p < 0,005$) de 34.4% des concentrations plasmatiques en T3 totale, 1 heure après l'administration de l'inhibiteur.

Une diminution significative de 38.2% des concentrations en T3 libre par rapport au niveau de base, a été également observée suite à l'administration de phénylbutazone ($p < 0.005$). Les concentrations en T3 libre ont ainsi varié de 5.12 ± 1.36 pg/mL (concentration de base) à 2.82 ± 1.08 pg/mL, 1 heure après l'administration de phénylbutazone.

Une diminution significative de 21.9 % des concentrations plasmatiques en T4 totale, par rapport au niveau de base, a été observée 1 heure après l'administration de phénylbutazone ($p < 0.05$). Les concentrations plasmatiques en T4 totales ont ainsi varié de 30.25 ± 3.91 ng/mL (concentration de base) à une valeur de 23.84 ± 6.15 ng/mL, 1 heure après l'administration de phénylbutazone.

Enfin, les concentrations plasmatiques en T4 libre ont varié de 5.58 ± 1.08 pg/mL à 4.38 ± 1.28 pg/mL une heure après l'administration de phénylbutazone. Cette différence n'a cependant pas été statistiquement significative ($p > 0.050$).

Le retour des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes à leurs valeurs de base a été observé au bout de 24 heures environ pour TT4 et FT4 et au bout de 48 heures environ pour TT3 et FT3.

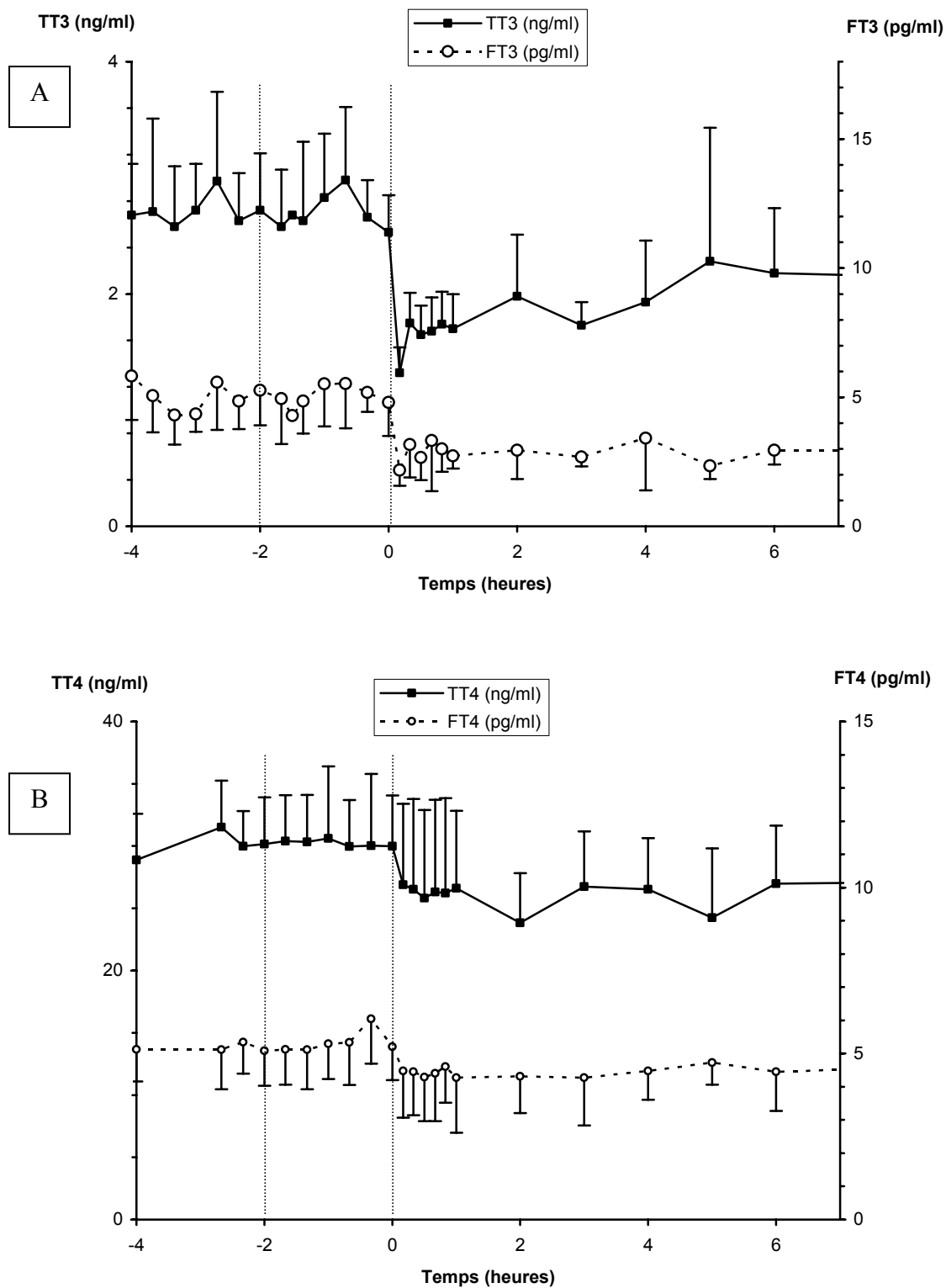


Figure 16 : Effet de l'administration intraveineuse de phénylbutazone (20 mg/kg) sur les concentrations plasmatiques totales et libres de T3 (A) chez les brebis THX supplémentées en T3 et sur les concentrations plasmatiques totales et libres de T4 (B) chez les brebis THX supplémentées en T4, (moyenne + écart type) (n=6 brebis). La première ligne verticale pointillée correspond à l'administration de l'excipient. La zone grisée correspond à la période qui suit l'administration de phénylbutazone au temps 0, schématisée par la deuxième ligne pointillée verticale.

	T3 totale (ng/mL)	T3 libre (pg/mL)	T4 totale (ng/mL)	T4 libre (pg/mL)
Moyenne (4h avant PB)	2.71 ± 0.49	5.12 ± 1.36	30.25 ± 3.91	5.58 ± 1.08
Moyenne (1h après PB)	1.64 ± 0.29	2.82 ± 1.08	23.84 ± 6.15	4.38 ± 1.28
Moyenne (6h après PB)	1.81 ± 0.50	2.85 ± 1.08	24.40 ± 5.65	4.5 ± 1.16
Diminution 1 h après (%)	34.4**	38.2**	21.9*	22.3

Tableau 9 : Valeurs moyennes globales ± écart-type (n=6 brebis) des concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres observées 4h avant et 1h après et 6h après l'administration de phénylbutazone. Pourcentage de diminution des concentrations plasmatiques 1 h après l'administration de phénylbutazone (*=p<0.05 ; **=p<0.005). PB=Phénylbutazone.

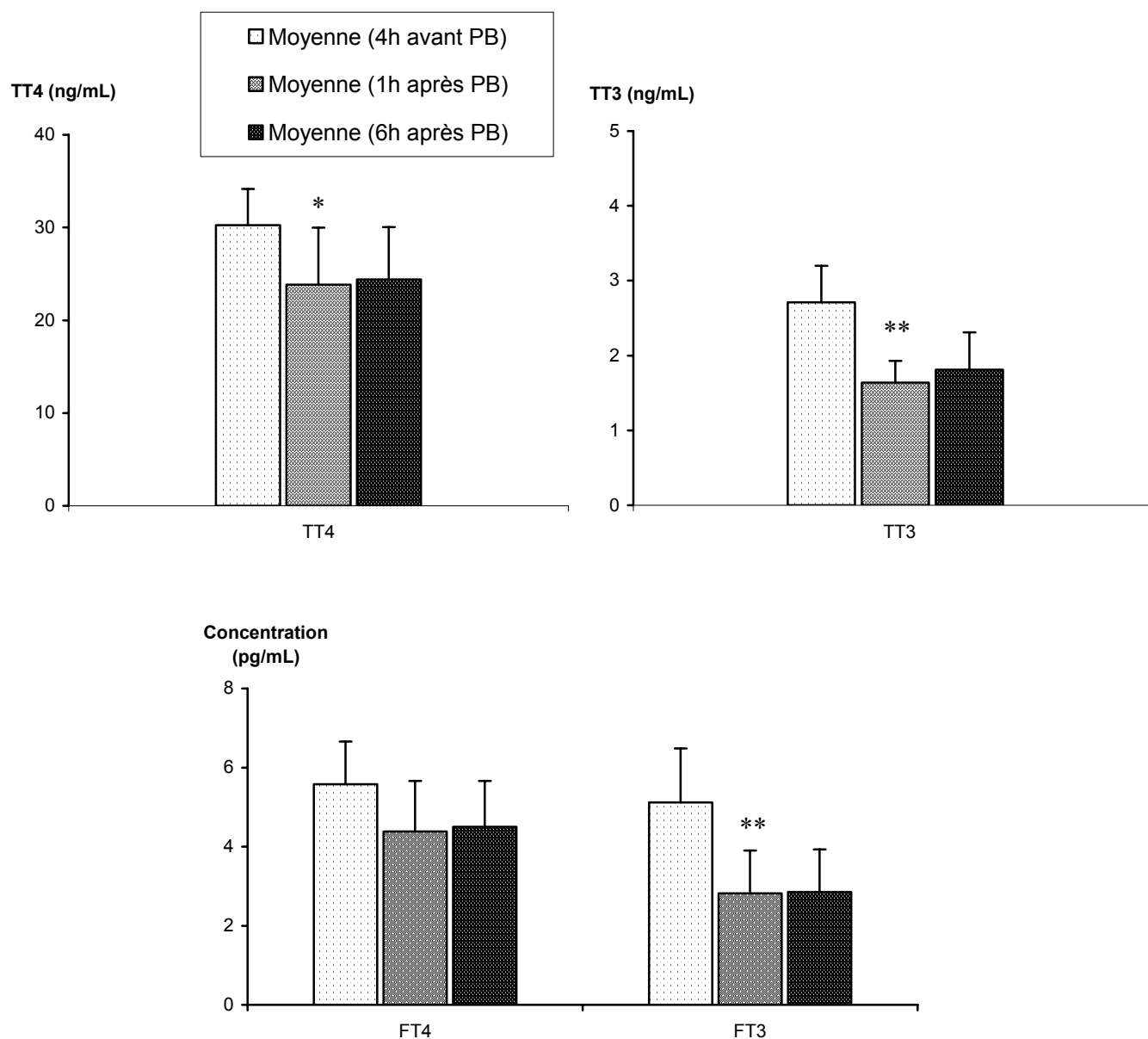


Figure 17 : Valeurs moyennes globales ± écart-type (n=6 brebis) de des concentrations plasmatiques en T3 et T4 totales et libres, 4h avant, 1h après et 6h après l'administration de phénylbutazone (*=p<0.05 ; **=p<0.005). PB=Phénylbutazone.

Rapport-Gratuit.com

DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de montrer l'importance de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques (TBG, TTR et Albumine) sur les concentrations en hormones thyroïdiennes et notamment de démontrer que les effets des manipulations pharmacologiques de la liaison des hormones thyroïdiennes réalisées *in vitro*, ne peuvent être extrapolés aux conditions qui président *in vivo*. Nous nous sommes donc attachés à montrer que dans les conditions *in vivo*, le déplacement des hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines plasmatiques n'entraîne pas d'augmentation des concentrations en hormones thyroïdiennes libres.

Pour réaliser ce déplacement, nous avons recherché un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques. C'est-à-dire une molécule qui serait capable de se fixer sur les sites de liaison des hormones thyroïdiennes des protéines plasmatiques.

Dans la littérature, plusieurs agents thérapeutiques tels que des anti-inflammatoires non stéroïdiens (dans cette étude l'acide méclofénamique et la phénylbutazone) et des diurétiques (le furosémide) ont été décrits comme étant des inhibiteurs compétitifs de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques ^(14, 43, 47, 59, 64). Lors d'essais pilotes nous avons donc évalué, dans les conditions *in vivo*, l'effet de l'administration de ces substances sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales et libres. Nous avons retenu la phénylbutazone comme inhibiteur compétitif potentiel. En effet, nous avons montré que l'administration de phénylbutazone à des brebis intactes ou thyroïdectomisées supplémentées en T4 était capable de diminuer les concentrations plasmatiques en T3 totale. Notre étude a été réalisée sur 6 brebis dont nous avons déterminé les profils nyctéméraux des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales et libres.

Les concentrations plasmatiques moyennes globales en T3 totale et T4 totale sont de 1.39 ± 0.35 ng/mL et 84.8 ± 20.1 ng/mL respectivement. Les concentrations plasmatiques moyennes globales en T3 libre (2.20 ± 0.70 pg/mL) et T4 libre (16.0 ± 4.17 pg/mL) obtenues chez la brebis sont proches des concentrations plasmatiques usuelles chez l'homme, comprises entre 2 et 4 pg/mL pour T3 libre et entre 8 et 18 pg/mL pour T4 libre ⁽⁷⁰⁾. La fraction libre de T3 représente 0.16% de la T3 plasmatique et celle de T4 représente 0.02% de la T4 plasmatique. Nous avons également évalué chez la brebis la clairance et le taux de production de T3 et de T4. La clairance de la T3 a été estimée, à 35.6 ± 4.22 mL/(kg.h) soit une valeur proche de celle décrite dans la littérature pour la brebis (47.5 mL/(kg.h) ⁽¹⁶⁾). La clairance de la T3

libre, plus élevée que celle de la T3 totale, a été estimée à 20059 ± 4111 mL/(kg.h). Cette différence souligne le rôle protecteur des protéines plasmatiques vis-à-vis des mécanismes de clairance. La clairance de la T4 totale a été estimée à 2.17 ± 0.33 mL/(kg.h) et celle de la T4 libre à 12027 ± 2662 mL/(kg.h). Les valeurs de la clairance des hormones thyroïdiennes chez l'homme sont de 14.4 ± 1.2 mL/(kg.h) pour la T3 totale et de 0.56 ± 0.03 mL/(kg.h) pour la T4 totale ⁽¹¹⁾. Dans notre étude, Le taux de production de la T3 a été estimé chez la brebis à 44.7 ng/(kg.h), celui de la T4 à 256 ng/(kg.h). Chez l'homme ce taux de production a été évalué à 18.53 ± 0.03 ng/(kg.h) pour T3 et à 60.71 ± 2.89 ng/(kg.h) pour T4 ⁽¹¹⁾.

Nous avons calculé les paramètres pharmacocinétiques de la liaison des hormones thyroïdiennes à leurs protéines de transport chez la brebis. Nous avons estimé le *Kd* du complexe T3-TBG 0.60 nM. Cette valeur est proche de celle trouvée dans la littérature ⁽⁶⁵⁾ pour la brebis. La constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3 est supérieure à celle décrite par Sutherland ⁽⁶⁵⁾ pour la T4 (0.11nM), ce qui est cohérent avec l'affinité inférieure de la TBG pour la T3 en comparaison avec son affinité pour la T4. La capacité maximale *Bmax*_{TBG} de la liaison des hormones thyroïdiennes à la TBG a été évaluée chez la brebis à 230 nM. Les résultats de cette étude, confrontés aux données obtenues chez l'homme, permettent de valider la brebis comme modèle d'étude de la fonction thyroïdienne, tout au moins en ce qui concerne les aspects de liaison aux protéines plasmatiques de ces hormones.

Nous avons vérifié ensuite que la phénylbutazone était capable de déplacer les hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison sur les protéines plasmatiques dans les conditions *in vitro*. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation des concentrations en hormones libres suite à l'ajout de phénylbutazone dans le plasma. Cet effet, cohérent avec notre hypothèse de départ, s'est observé pour des concentrations en phénylbutazone supérieures à 200 µg/mL.

Enfin, nous avons évalué l'effet de l'administration de phénylbutazone, inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques, sur les concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres de brebis thyroïdectomisées supplémentées en hormones thyroïdiennes. Dans le but d'écarter un éventuel effet de l'excipient de la *Phénylarthrite*ND, nous avons évalué son effet sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes en l'administrant seul deux heures avant l'administration de phénylbutazone. L'excipient n'a entraîné aucune modification des concentrations hormonales.

Dans les conditions *in vivo*, l'administration de phénylbutazone a induit une diminution significative des concentrations en T3 et T4 totales associée à une diminution significative des concentrations en T3 libre. Comme nous l'avons signalé dans la discussion précédente (Cf. Chapitre 2.1.3 Discussion), ce sont les variations des concentrations plasmatiques de T3, chez les brebis supplémentées en T3, qui sont susceptibles de représenter aux mieux les effets d'un inhibiteur compétitif. En effet, la possibilité de désiodation périphérique de T4 en T3 au niveau du foie constitue un facteur de confusion propre à modifier les concentrations en T4.

A partir des données des paramètres pharmacocinétiques de la phénylbutazone chez la brebis précédemment évaluées au laboratoire (résultats non publiés), nous avons simulé les concentrations plasmatiques en phénylbutazone observées après l'administration intraveineuse de phénylbutazone à la dose de 20 mg/kg. Ces concentrations sont supérieures à 200 µg/mL au cours de l'heure qui suit l'administration de phénylbutazone. L'effet de la phénylbutazone sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales observée dans notre étude peut être donc attribué au déplacement des hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines plasmatiques, effet que nous avons démontré dans les conditions *in vitro* pour des concentrations en phénylbutazone supérieures ou égales à 200 µg/mL. Nous avons également vérifié que l'addition de phénylbutazone au plasma ne modifiait pas les concentrations en hormones thyroïdiennes totales et n'interagissait donc pas avec le dosage des hormones thyroïdiennes totales (Cf. Chap. 2 2. Approche *in vitro*). L'ensemble de ces résultats démontre que le déplacement des hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines plasmatiques induit une diminution des concentrations plasmatiques en hormones totales. Ces résultats montrent que les effets des manipulations pharmacologiques de la liaison de T3 aux protéines plasmatiques réalisées *in vitro* ne peuvent pas être extrapolés *in vivo*.

En ce qui concerne l'effet de la phénylbutazone sur les concentrations en hormones thyroïdiennes libres dans les conditions *in vivo*, les résultats obtenus par dosage radio-immunologique doivent être analysés avec prudence. En effet, nous avons montré, lors de l'approche *in vitro*, que l'addition de phénylbutazone ne modifiait pas les concentrations en hormones libres évaluées par dosage radio-immunologique, alors que la dialyse à l'équilibre (méthode de référence) couplée à la méthode de précipitation de la T3 radiomarquée nous a permis de montrer que la phénylbutazone, ajoutée au plasma dans les mêmes proportions, a entraîné une augmentation de la fraction libre en hormones thyroïdiennes (Cf. Chap. 2 2. Approche *in vitro*). Nous ne pouvons donc pas conclure quand à l'effet de l'administration de

phénylbutazone à brebis thyroïdectomisées supplémentées en hormones thyroïdiennes sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes libres.

Pour valider notre hypothèse, l'alternative peut être l'utilisation, comme dans l'approche *in vitro*, de la méthode de dialyse à l'équilibre couplée à la précipitation de la T3 radiomarquée qui nous permettrait d'évaluer les pourcentages d'hormones thyroïdiennes libres dans nos échantillons de plasma, avant et après l'administration de phénylbutazone. Les concentrations en hormones libres seraient déduites de ce pourcentage et du dosage radio-immunologique des concentrations en hormones thyroïdiennes totales.

Les nombreuses manipulations nécessaires à la réalisation de cette méthode (dialyse, précipitation, dosage des hormones totales) constituent autant de sources possibles de variations, qu'il sera important d'évaluer.

En conclusion, nous avons montré que l'administration d'un inhibiteur de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques induit une diminution des concentrations en hormones totales. Ce résultat montre que l'effet des manipulations de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques réalisés *in vitro* ne peuvent être extrapolés aux conditions *in vivo* et que les protéines plasmatiques jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mr CRIQUI Alexandre, Joseph, André

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 6/07/2006

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, H. LEFEBVRE, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Mr CRIQUI Alexandre, Joseph, André

intitulée :

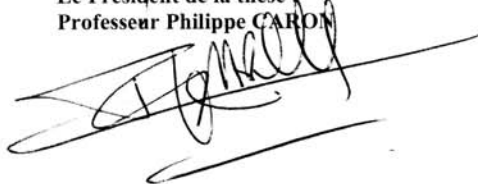
Influence de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques sur l'homéostasie de la fonction thyroïdienne

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Véronique GAYRARD-TROY**

**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu : 3 Novembre 2006
Le Président de la thèse :
Professeur Philippe CARON**



**Vu le : 10 NOV. 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



Références bibliographiques

- 1 ABIODUN, M.O., BIRD R, HAVARD, C.W., SOOD, N.K. The effects of phenylbutazone on thyroid function. *Acta Endocrinologica*, 1973, **72**, 257-264.
- 2 AZIZI, F., VAGENAKIS, A.G., PORTNAY, G.I. Thyroxine transport and metabolism in methadone and heroin addicts. *Annals of Internal Medicine*, 1974, **80**, 194-199.
- 3 BARBOSA, J., SEAL, U.S., DOE, R.P. Effects of anabolic steroids on hormone-binding proteins, serum cortisol and serum nonprotein-bound cortisol. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1971, **32**, 232-240.
- 4 BEEEX, L., ROSS, A., SMALS, P., KLOPPENBORG, P. 5-fluorouracil-induced increase of total thyroxine and triiodothyronine. *Cancer Treatment Report*, 1977, **61**, 1291-1295.
- 5 BLAKE, C.C., OATLEY, S.J. Protein DNA and protein-hormone interactions in prealbumin: a model of the thyroid hormone receptor. *Nature*, 1977, **268**, 115-120.
- 6 BRAVERMAN, L.E., INGBAR, S.H. Effects of norethrandolone on the transport in serum and peripheral turnover of thyroxine. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1967, **27**, 389-396.
- 7 BROWN MEDICAL SCHOOL. Adresse URL : <http://bms.brown.edu/curriculum/b189/Lab12/thyroid.jpg>. Page consultée le 01/11/2006.
- 8 CAVALIERI, R.R., MCMAHON, F.A., CASTLE, J.N. Preparation of 125-I-labeled human thyroxine-binding globulin alpha globulin and its turnover in normal and hypothyroid subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 1975, **56**, 79-87.
- 9 CAVALIERI, R.R., STEINBERG, M., SEARLE, G.L. The distribution kinetics of triiodothyronine: studies of euthyroid subjects with decreased plasma thyroxine-binding globulin and patient with Graves' disease. *Journal of Clinical Investigation*, 1970, **49**, 1041-1045.
- 10 CHAN, V., BESSER, G.M., LANDON, J. Effects of oestrogen on urinary thyrosine excretion. *British Medical Journal*, 1972, **4**, 699-701.
- 11 CHOPRA, I.J. An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) in man. *Journal of Clinical Investigation*, 1976, **58**, 32-40.
- 12 CHRISTENSEN, L.K. Thyroxine-releasing effect of salicylate and of 2,4-dinitrophenol. *Nature*, 1959, **183**, 1189-1190.
- 13 COLONNA, M., GROSCLAUDE, P., REMONTET, L., SCHVARTZ, C. Incidence of thyroid cancer in adults recorded by French cancer registries (1978-1997). *European Journal of Cancer*, 2002, **38**, 1762-1770.
- 14 DAMINET, S., CROUBELS, S., DUCHATEAU, L., DEBUNNE, A. Influence of acetylsalicylic acid and ketoprofen on canine thyroid function tests. *The veterinary journal*, 2003, **166**, 224-232.
- 15 DAVIS, P.J., HSU, T.H., BIANCHINE, J.R., MORGAN, J.P. Effects of a new hypolipidemic agent, MK-185, on serum thyroxine-binding globulin and dialysable fraction thyroxine. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1972, **34**, 200-208.
- 16 DE PABLO-DAVILA, F., MIRALLES-GARCIA, J.M., et al. Study of the kinetics of the thyroid hormones and the peripheral conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in acute renal insufficiency under experimental conditions. *Hormone and Metabolic Research*, 1980, **12**, 529-36.
- 17 DEGROOT, L.J. Mechanisms of action of thyroid hormone In : *Endocrinology USA* : W.B. Saunders Company, 1989, 2nd edition, Vol.1, 563-571.
- 18 DEGROOT, L.J. Thyroid hormone secretion In : *Endocrinology USA* : W.B. Saunders Company, 1989, 2nd edition, Vol.1, 523-537.

- 19 DEGROOT, L.J. Transport, cellular uptake and metabolism of thyroid hormone. In : Endocrinology USA : W.B. Saunders Company, 1989, 2nd edition, Vol.1, 541-555.
- 20 DEGROOT, L.J. Transport, cellular uptake and metabolism of thyroid hormone. In : Endocrinology USA : W.B. Saunders Company, 1989, 2nd edition, Vol.1, 544.
- 21 DOHLER, K.D, WONG, C.C. The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. *Pharmacology and Therapeutics*, 1979, **5**, 305-18.
- 22 DUSSAULT, J.H., FISHER, D.A. Thyroxine et Triiodothyronine libres chez la brebis et son foetus. *Un Med Can*, 1972, **101**, 689-691.
- 23 FUJITA, H. Fine structure of the thyroid gland. *International Review of Cytology*, 1975, **40**, 197-280.
- 24 GARNIK, M.B., LARSEN, P.R. Acute deficiency of thyroxine-binding globulin during L-asparaginase therapy. *The New England Journal of Medicine*, 1979, **301**, 252-253.
- 25 GEORGIEV, P., PETKOV, P.I. Comparative radioisotope study of thyroid gland function in some species of farm animal. *Veterinarno-meditsinski nauki*, 1981, **18**, 82-86.
- 26 GOUSIS, O.S., THEODOROPOULOS, T.J. Dilantin and salicylate effects on hepatic thyroxine bio-availability and dialyzable thyroxine. *Hormone and Metabolic Research*, 1990, **22**, 342-344.
- 27 GUYTON, A.C. The thyroid metabolic hormones. In : Textbook of medical physiology, 8th ed. Philadelphia, 1991, 831-841.
- 28 HABEL, R.E. In : Guide to the dissection of domestic ruminants. 4th Edition, 1989, 14-16.
- 29 HOCH, H., LEWALLEN, C.G. Low affinity binding of thyroxine to proteins of human serum. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1974, **38**, 663-673.
- 30 HOCMAN, G. Human thyroxine binding globulin (TBG). *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 1981, **91**, 45-89.
- 31 HOLLANDER, C.S., SCOTT, R.L., BURGESS, J.A. Free fatty acids: a possible regulator of free thyroid hormone levels in man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1967, **27**, 1219-1223.
- 32 HURLEY, P.M., HILL, R.N., WHITING, R.J. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect*, 1998, **106**, 437-445.
- 33 INGBAR, S.H. Prealbumin : a thyroxine binding protein of human plasma. *Endocrinology*, 1958, **63**, 256-259.
- 34 INSTITUT NATIONAL DE VEILLE SANITAIRE. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Adresse URL : http://www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport_cancer_2003/index.html. Page consultée le 20/11/2006.
- 35 IRVINE, C.H.G. Four compartment model of thyroxine metabolism. In : Thyroid Hormone Metabolism. London: Academic Press, 1975, 263.
- 36 KANEKO, J.J. Thyroid function In : Clinical biochemistry of domestic animals, 5th edition San Diego : Academic Press, 1997, 571-588.
- 37 KAPTEIN, E.M., MOORE, G.E., FERGUSON, D.C., HOENIG, M. Effects of prednisolone on thyronine and 3,5,3'-triiodothyronine metabolism in normal dog. *Endocrinology*, 1992, **130**, 1669-1679.
- 38 KAVLOCK, R.J ,ANKLEY, G.T. A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Analysis*, 1996, **16**, 731-739.
- 39 LARSEN, P.R. Salicylate-induced increases in triiodothyronine in human serum: evidence of inhibition of triiodothyronine binding to thyroxine-binding globulin and thyroxine-binding prealbumin. *Journal of Clinical Investigation*, 1972, **51**, 1125-1134.
- 40 LARSEN, P.R., WILSON, J.D., FOSTER, D.W., KRONENBERG, H.M., et al. Thyroid. In : Williams textbook of endocrinology. USA : WB Saunders company, 1998, 389-515.

- 41 LEO K. Thyroid function in domestic animals. *Laboratory Animal Care by the American Association for Laboratory Animal Science*, 1970, **20**, 561-581.
- 42 LYNCH, M.A., Andrews, J.F., Moore, R.E. Administration of low doses of TSH result in a rapid increase in the metabolic rate of young lambs. *Hormon and metabolic research*, 1985, **17**, 136-140.
- 43 MARSHALL, J.S., TOMPKINS, L.S. Effect of o,p'-DDD and similar compounds on thyroxine-binding globulin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1968, **28**, 386-393.
- 44 MCCLAIN, R.M. Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutation Research*, 1995, **333**, 131-142.
- 45 MICHAJLOVSKIJ, N., LANGER, P. Increase of serum free thyroxine following the administration of thiocyanate and other anions in vivo and in vitro. *ACTA Endocrinologica*, 1974, **75**, 707-716.
- 46 MORRIS, D.D., GARCIA, M. Thyroid stimulating hormone: response test in healthy horses, and effect of phenylbutazone on equine thyroid hormone. *American Journal of Veterinary Research*, 1983, **44**, 503-507.
- 47 MUNRO, S.L, LIM, C. F, HALL, J.G, BARLOW, J.W, CRAIK, D.J. Drug competition for thyroxine binding to transthyretin (prealbumin): comparison with effects on thyroxine-binding globulin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1989, **68**, 1141-1147.
- 48 NICOLOFF, J.T., LOW, J.C, DUSSAULT, J.H, FISHER, D.A. Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turn over kinetics in Man. *Journal of Clinical Investigation*, 1972, **51**, 473-476.
- 49 NORRIS, D.O. In : Vertebrate endocrinology, 2nd edition Philadelphia, 1985.
- 50 OLTMAN, J.E, FRIEDMAN, S. Protein-bound iodine in patients receiving perphenazine. *Journal of the American Medical Association*, 1963, **185**, 726-727.
- 51 OPENHEIMEIR, J.H. Role of plasma proteins in the binding, distribution, and metabolism of the thyroid hormones. *The New England Journal of Medicine*, 1968, **278**, 1153-1162.
- 52 OPPENHEIMER, J.H., Tavernetti, R.R. Displacement of thyroxine from human thyroxine-binding globulin by analogues of hydantoin. Steric aspects of the thyroxine-binding site. *Journal of Clinical Investigation*, **41**, 1972, 2213-2220.
- 53 OPPENHEIMER, J.H., WERNER, S.C. Effect of prednisone on thyroxine-binding proteins. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1966, **26**, 715-721.
- 54 PATERSON, P.A. Characteristics of vitamin A-transporting protein complex occurring in human serum. *Journal of Biological Chemistry*, 1971, **246**, 34-43.
- 55 POWER, D.M., ELIAS, N.P., RICHARDSON, S.J., MENDES, J. et al. Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, **119**, 241-255.
- 56 RAMIREZ, S., WOLFSHEIMER, K.J., MOORE, R.M., MORA, F. Duration effects of phenylbutazone on serum total thyroxine and free thyroxine concentrations in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1997, **11**, 371-394.
- 57 REFETOFF, S., ROBIN, N.I., FANG, V.S. Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrates species: A study of PBI, serum T4, free T4, and the pattern of T4 and T3 binding to serum proteins. *Endocrinology*, 1970, **86**, 793-805.
- 58 ROWLAND, M., TOZER, T.N. In : Clinicals Pharmacokinetics : concepts and Applications Baltimore, Williams and Wilkins, 3rd edition, 1995.
- 59 SAMUELS, M.H., PILLOTE, K., ASHER, D., et al. Variable effects of nonsteroidal antiinflammatory agents on thyroid test results. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, **88**, 5710-5716.
- 60 SCHUSSLER, G.C. Diazepam competes for thyroxine binding. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1971, **178**, 204-209.
- 61 SCHUSSLER, G.C. The thyroid binding proteins. *Thyroid*, 2002, **10**, 141-9.
- 62 STERLING, K., BRENNER, M.A. Free thyroxine in human serum : simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *Journal of Clinical Investigation*, 1966, **45**, 153-156.

- 63 STERLING, K., HEGEDUS, A. Measurement of free thyroxine concentration in human serum. *Journal of Clinical Investigation*, 1962, **41**, 1031.
- 64 STOCKIGT, J.R., LIM, C.F., BARLOW, J.W. Interaction of furosemide with serum thyroxine binding sites: in vivo and in vitro studies and comparison with other inhibitors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1985, **60**, 1025-1030.
- 65 STOCKIGT, J.R., LIM, C.F., BARLOW, J.W., WYNNE, K.N., MOHR, V.S., et al. Interaction of furosemide with serum thyroxine binding sites: in vivo and in vitro studies and comparison with other inhibitors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1985, **60**, 1025-1030.
- 66 SUTHERLAND, R.L., SIMPSON-MORGAN, M.W. The thyroxine-binding properties of serum proteins. A competitive binding technique employing sephadex G-25. *Journal of Endocrinology*, 1975, **65**, 319-332.
- 67 TABACHNICK, M., HAO, Y.L., KORCEK L. Effect of oleate, diphenylhydantoin, and heparin on the binding of 125I-thyroxine to purified thyroxine-binding globulin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1973, **36**, 392-394.
- 68 TAYLOR, R., CLARK, F., GRIFFITHS, I.D., WEEKE, J. Prospective study of effect of fenclufenac on thyroid function tests. *British Medical Journal*, 1980, **281**, 911-912.
- 69 TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Free drug fraction vs free drug concentration: a matter of frequent confusion. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2002, **25**, 460-463.
- 70 UNIVERSITE DE REIMS. Les outils du diagnostic en pathologie thyroïdienne. 20/11/2006. Adresse URL : http://helios.univ-reims.fr/UFR/Medecine/fmi/plancours/cycle2/module13/pdf/Outils_exporation_thyroïdienne_246_248_P.pdf. Page consultée le 01/11/2006.
- 71 WANG, R., NELSON, J.C., WILCOX, R.B. Salsalate administration - a potential pharmacological model of the sick euthyroid syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998, **83**, 3095-3099.
- 72 WOEBER, K.A., INGBAR, S.H. The contribution of thyroxine-binding prealbumin to the binding of thyroxine in the human serum, as assessed by immunoabsorption. *Journal of Clinical Investigation*, 1969, **47**, 1710-1721.
- 73 ZOELLER, R.T. Challenges confronting risk analysis of potential thyroid toxicants. *Risk analysis*, 2003, **23**, 1, 143-162.

TOULOUSE, 2006

NOM : CRIQUI

PRENOM : ALEXANDRE

TITRE : INFLUENCE DE LA LIAISON DES HORMONES THYROÏDIENNES AUX PROTEINES PLASMATIQUES SUR L'HOMÉOSTASIE DE LA FONCTION THYROÏDIENNE.

RESUME :

L'objectif de ce travail est de contribuer à la compréhension du rôle des protéines de liaison spécifique des hormones thyroïdiennes, sur l'homéostasie de la fonction thyroïdienne.

Pour cela, nous avons choisi un inhibiteur compétitif de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques, administrable *in vivo* à la brebis, en testant la capacité de plusieurs molécules à déplacer les hormones de leurs sites de fixation. Nous avons retenu comme inhibiteur la phénylbutazone.

Puis nous avons testé, *in vitro*, la capacité de la phénylbutazone à déplacer les hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison.

Enfin, nous avons étudié les variations des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes, suite à l'administration de phénylbutazone à des brebis thyroïdectomisées supplémentées en T3 ou T4. Nous avons observé que l'administration de phénylbutazone a induit une diminution des concentrations en T3 totale, T4 totale et T3 libre.

MOTS CLES : LIAISON – HORMONE THYROÏDIENNE – PROTEINE – OVIN – PHENYLBUTAZONE – IN VIVO – IN VITRO

ENGLISH TITLE : INFLUENCE OF THE THYROID HORMONES BINDING WITH PLASMATIC PROTEINS ON THE HOMEOSTASIS OF THE THYROID FUNCTION.

ABSTRACT :

This study aims to contribute to the comprehension of the role of binding proteins specific to thyroid hormones on the homeostasis of the thyroid function.

For that, we choose a competitive inhibitor of the thyroid hormones binding with plasmatic proteins, by evaluating the ability of several molecules to displace hormones from their binding sites. We chose phenylbutazone as a competitive inhibitor.

In a second time, we tested, in *in vitro* conditions, the ability of phenylbutazone to displace thyroid hormones from their binding sites.

Finally, we studied variations of the plasmatic concentrations in total and free thyroid hormones, following phenylbutazone administration to thyroidectomized ewes supplemented with T3 or T4. We noted that phenylbutazone administration induced a reduction in total T3 (T4) concentrations associated with a reduction in free T3 concentrations.

KEY WORDS : BINDING – THYROID HORMONE - PROTEIN - SHEEP – PHENYLBUTAZONE – IN VIVO – IN VITRO

Imp : S.A.R.L. NOTREL – 31300 TOULOUSE