

Quelles valeurs de référence pour la concentration de la sérotonine plaquettaire et du 5-HIAA urinaire pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines digestives ?

Determination of thresholds values for platelet serotonin and urinary 5-HIAA concentrations for the biological diagnosis of digestive neuroendocrine tumors

Maël Padelli¹

Clément Bruno^{1,2}

Julia Lemarchand¹

Patrick Voure'h^{1,2}

Christian Andres^{1,2}

Hélène Blasco^{1,2}

Isabelle Benz-de Bretagne^{1,2}

¹ Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, CHRU de Tours, France
<isabelle.benz-debretagne@univ-tours.fr>

² UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France

Résumé. *Objectif:* La sérotonine plaquettaire et son métabolite urinaire, l'acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) sont les principaux marqueurs biologiques utilisés pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines digestives (TNE). Les valeurs de référence données par les fournisseurs des kits de dosage aboutissent à l'observation de faux positifs ou faux négatifs pour les 2 dosages. L'objectif de cette étude est de déterminer nos propres valeurs seuils pour ces deux paramètres afin d'optimiser la détection des TNE. *Méthode :* Les patients ayant bénéficié d'un dosage de sérotonine plaquettaire et/ou de 5-HIAA urinaire au CHRU de Tours entre janvier 2005 et juin 2016 ont été étudiés. Une cohorte « index » constituée de 75 % des patients a permis de définir les valeurs seuils de l'étude. Une cohorte « validation » constituée de 25 % des patients a permis de comparer les performances des valeurs du fournisseur avec les valeurs seuils de l'étude. *Résultats :* 219 patients ont été inclus, dont 19 atteints de TNE. La valeur seuil pour la sérotonine plaquettaire a été établie à 5,13 amol/plaquette, celle du 5-HIAA urinaire à 3,60 µmol/mmol de créatinine urinaire. La spécificité de la sérotonine était meilleure avec la valeur seuil de l'étude (0,654 vs 0,533) pour une sensibilité identique (0,75). La sensibilité du 5-HIAA était améliorée par la valeur seuil de l'étude (1 vs 0,667) pour une spécificité identique (0,902). *Conclusion :* L'utilisation des valeurs seuils établies dans cette étude a permis d'améliorer les performances diagnostiques des marqueurs biochimiques pour la recherche de TNE dans notre laboratoire.

Mots clés : sérotonine plaquettaire, 5-HIAA urinaire, tumeurs neuroendocrines digestives, valeurs seuils

Abstract. *Objectives:* Platelet serotonin and its urinary metabolite 5-HIAA (5-hydroxyindolacetic acid) are the main biomarkers measured for the detection of neuroendocrine tumors (NET). We observe in our laboratory many false positives or false negatives for the 2 assays using threshold values given by the manufacturer. We aim to determine our own local threshold values for a better detection of gastrointestinal NETs. *Methods:* We studied patients with measurement of platelet serotonin and/or urinary 5-HIAA in University Hospital of Tours between January 2005 and June 2016. We established an « index » cohort with 75% of patients to determine local threshold value for the 2 parameters. A « validation » cohort constituted with 25% of remaining patients allowed

Article reçu le 29 juin 2018,
accepté le 28 février 2019

Tirés à part : I. Benz-de Bretagne

us to compare the performances of manufacturer's values with local threshold values. *Results*: Two hundred ninety patients were included, with 19 suffering from NETs. Local threshold value for platelet serotonin was determined at 5.13 amol/platelet, the one for urinary 5-HIAA at 3.60 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ urinary creatinine. Platelet serotonin specificity was better with local threshold value for identical sensibility (0.75). Urinary 5-HIAA sensibility was improved with local threshold value (1 vs 0.667) for identical specificity (0.902). *Conclusion*: Using our local threshold value for platelet serotonin and urinary 5-HIAA improved diagnostic performances of these biochemical markers to detect NETs.

Key words: platelet serotonin, urinary 5-HIAA, digestive neuroendocrine tumors, threshold values

Les tumeurs neuroendocrines (TNE), anciennement appelées tumeurs carcinoïdes, ont une incidence relativement faible, 2 à 5 cas pour 100 000 habitants [1], mais représentent un défi diagnostique du fait de leur présentation aussi variée qu'aspécifique. Sont distinguées les TNE digestives qui dérivent de l'intestin primitif et les TNE extra-digestives comme le carcinome à cellule de Merkel (carcinome cutané) ou le phéochromocytome (histologiquement bénin). Les TNE digestives sont des tumeurs malignes qui, de par leur origine embryologique, peuvent se situer aussi bien au niveau du tube digestif, de l'estomac au rectum, qu'au niveau du pancréas, de la trachée, du thymus ou des bronches. Les tumeurs fonctionnelles développent des syndromes cliniques caractéristiques contrairement aux tumeurs non fonctionnelles qui sont diagnostiquées fortuitement ou à un stade avancé. Le syndrome carcinoïde est principalement secondaire à l'augmentation de sécrétion de la sérotonine. Il n'est présent que dans 20 à 30 % des TNE jéjuno-iléales [2] et conjugue des signes digestifs (diarrhée chronique, douleurs abdominales) et des signes vasomoteurs (flush, sueurs, tremblements). Le diagnostic est d'autant plus difficile que l'imagerie peut être prise à défaut. Le diagnostic est ainsi retardé et actuellement 45 % des patients présentent des métastases au moment où il est posé [3]. Les dosages biologiques de la sérotonine et de son métabolite urinaire, l'acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA), prennent une importance capitale pour ne pas méconnaître une TNE devant une symptomatologie clinique compatible [4]. De nombreux autres biomarqueurs spécifiques et généraux peuvent être sécrétés par les TNE, la chromogranine A étant le marqueur général le plus sensible [5]. Les valeurs de référence utilisées actuellement et recommandées par les fournisseurs pour la sérotonine et le 5-HIAA sont issues d'une étude sur un faible échantillon de sujets sains [6]. Cependant, de nombreux bilans sont demandés pour des patients présentant déjà une symptomatologie, en particulier une diarrhée chronique qui est susceptible d'être associée à une augmentation de la sérotoninémie même en l'absence de TNE [7]. De plus, nous

observons au laboratoire des cas de TNE non détectées avec les valeurs de référence fournisseur de 5-HIAA urinaire et de nombreux faux positifs avec les valeurs « fournisseur » de sérotonine. Ces observations nous conduisent à établir nos propres valeurs de référence pour la sérotonine plaquettaire et le 5-HIAA urinaire des 24 heures. Cet objectif s'inscrit dans une démarche de qualité, d'accréditation des laboratoires, pour une meilleure détection des TNE digestives.

Patients et méthodes

Population étudiée

Nous avons mené une étude rétrospective de janvier 2005 à juin 2016 au CHU de Tours, en répertoriant tous les patients pour lesquels un dosage de sérotonine plaquettaire et/ou de 5-HIAA urinaire a été réalisé. Seuls les patients pour lesquels une recherche diagnostique de TNE motivant la réalisation de ces examens ont été inclus. Ont été exclus de l'étude : les patients de moins de 18 ans, les patients ayant reçu un traitement curatif de la TNE (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) avant dosage de sérotonine ou de 5-HIAA et les patients ayant des antécédents de TNE. Les renseignements démographiques, cliniques et biologiques ont été extraits des dossiers informatisés des patients. Le diagnostic retenu était celui éclairé par les conclusions de l'examen histologique pour attester ou non de la présence d'une TNE.

Phase pré-analytique

Les prélèvements pour le dosage de la sérotonine plaquettaire et du 5-HIAA urinaire des 24 heures étaient réalisés après un régime strict excluant toute prise d'aliment ou de produit pharmaceutique riche en sérotonine ou en son précurseur, le tryptophane. Le patient devait ainsi s'abstenir de consommer, dans les 3 jours précédant le prélèvement et pendant les 24 heures du recueil urinaire, les aliments et produits suivants :

– alcool, amande, ananas, aubergine, avocat, banane, datte, kiwi, melon, miel, noisette, noix du Brésil, noix de cajou, noix de coco, noix de macadamia, prune, tomate ;

– sirops pour la toux et autres préparations contenant du gaïacololate de glycéryle, de l'acétaminophène, de la phénacétine et des phénothiazines. Ces informations sont données au personnel soignant *via* le manuel de prélèvement du CHU.

Le prélèvement sanguin était réalisé à jeun, une augmentation de la sérotoninémie étant observée dans les heures qui suivent la prise alimentaire [8]. Le prélèvement veineux était effectué sur deux tubes EDTA de 7 mL, puis immédiatement conservé dans la glace. Le plasma riche en plaquettes était préparé dans l'heure qui suit le prélèvement par une centrifugation lente de 15 min à 100 g et à +4 °C. Le surnageant était éliminé et la numération plaquettaire était déterminée à l'aide de l'automate Coulter LH780 (Beckman Coulter). Les échantillons étaient ensuite stockés à -20 °C et analysés dans la semaine qui suivait le prélèvement [9]. Le recueil urinaire sur 24 heures était réalisé dans des flacons de plastique blanc de 2 L (Cooperation pharma FRSE SA) acidifiés par 10 mL d'acide chlorhydrique à 6 mol/L. Une mesure systématique du pH urinaire était réalisée pour attester de la bonne acidification des urines avec un objectif de pH compris entre 2 et 3 [10]. Afin de s'affranchir de l'impact de la diurèse sur le résultat, les concentrations de 5-HIAA urinaire étaient rapportées à la créatininurie. La concentration de la créatinine urinaire était déterminée par la méthode de Jaffé compensée et raccordée à la méthode de référence (dilution isotopique associée à des méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse) sur un automate AU 2700 Plus (Beckman Coulter®, Fullerton, USA). Les échantillons étaient stockés à -20 °C et analysés dans la semaine qui suivait le prélèvement.

Phase analytique

Les concentrations de sérotonine plaquettaire et de 5-HIAA urinaire des 24 heures étaient déterminées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à une détection électrochimique via l'utilisation du kit « Serotonin in serum/plasma/whole blood – HPLC » de Chromsystems® (Münich, Allemagne) certifié CE.

Le kit « Serotonin in serum/plasma/whole blood – HPLC » de Chromsystems® (Münich, Allemagne) était utilisé pour réaliser le dosage de la sérotonine plaquettaire. Cent microlitres de plasma riche en plaquettes étaient mélangés à 100 µL d'étalon interne et à 100 µL de réactif précipitant, puis centrifugés 10 minutes à 11 000 g. Les échantillons étaient ensuite élués dans un système chromatographique composé d'une chaîne HPLC DIONEX Ultimate 7000 pump (Dionex, Sunnyvale, US) et d'un détecteur électrochimique WATERS 246 (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines,

France). Après calibration, la concentration en sérotonine était déterminée à partir de l'aire du pic chromatographique de la sérotonine rapportée à celle du pic de l'étalon interne. La sérotonine plaquettaire était exprimée en amol (attomole – 10⁻¹⁸) de sérotonine par plaquette en rapportant la concentration de sérotonine obtenue par HPLC par la numération plaquettaire.

Le dosage du 5-HIAA urinaire était réalisé sur le même système chromatographique que la sérotonine à l'aide du kit « VMA, HVA and 5-HIAA in Urine » de Recipe® (Münich, Allemagne). La concentration de 5-HIAA urinaire était déterminée, après calibration, en fonction des aires respectives des pics chromatographiques du 5-HIAA et de l'étalon interne. La concentration urinaire en 5-HIAA était exprimée en µmol/mmol de créatinine urinaire.

Les dosages de deux niveaux de contrôle de qualité interne (CQI) étaient réalisés avant et après chaque série. Les CQI de Chromsystems® étaient utilisés pour le dosage de la sérotonine et les CQI de Recipe® pour le dosage du 5-HIAA.

Valeurs de référence

Les valeurs de référence de la sérotonine plaquettaire données par le fournisseur (Chromsystems®) étaient de 2,94-4,68 amol/plaquette et sont issues de l'étude de Fla-chaire *et al.* [5]. Les valeurs de référence pour le 5-HIAA urinaire des 24 heures étaient données par le fournisseur (ClinRep) en mg/24h (2-8 mg/24h) ne permettant pas d'ajuster le résultat à la créatininurie. Notre laboratoire utilisait les valeurs de référence pour le 5-HIAA urinaire de 1,13 à 4,54 µmol/mmol de créatinine urinaire avec une créatininurie moyenne de 9,25 mmol/24h déterminée au laboratoire.

Méthodologie statistique

Afin de déterminer nos propres valeurs de référence, nous avons scindé notre population en 2 cohortes distinctes :

– une cohorte « index » constituée de 75 % des patients choisis aléatoirement. Cette cohorte a permis de déterminer les valeurs seuils diagnostiques (valeurs « étude ») de sérotonine plaquettaire et de 5-HIAA urinaire et d'évaluer leurs performances grâce aux courbes ROC (*receiver operating characteristics*) ;

– une cohorte « validation » constituée des 25 % de patients restants. Cette cohorte nous a permis de comparer la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) de la valeur seuil fournisseur et de la valeur seuil « étude » pour chacun des marqueurs.

Les valeurs seuils ont été déterminées sur la cohorte « index » par maximisation de l'index de Youden. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R (version 3.4.4, The R Foundation for Statistical Computing Platform) et le package pROC [11].

Résultats

Population

Deux cent dix-neuf sujets ont été inclus dans l'étude dont 19 ayant une TNE (figure 1). Ils ont été répartis aléatoirement entre une cohorte « index » de 165 patients dont 14 avec une TNE et une cohorte « validation » de 54 patients dont 5 avec une TNE. Les caractéristiques démographiques, biologiques et le diagnostic des patients sont présentés dans le tableau 1. Le ratio homme/femme était de 0,90 dans la population de l'étude avec un âge médian de 57,5 ans. Ce ratio était de 2,17 parmi les patients ayant une TNE, avec un âge médian de 68 ans. Cent dix-neuf patients (54,3 %) ont bénéficié d'un dosage de sérotonine plaquettaire dont 14 patients ayant une TNE, tandis qu'un dosage de 5-HIAA urinaire a été réalisé chez 154 patients (70,3 %) dont 11 patients avec une TNE. Seuls 54 patients (24,7 %) ont bénéficié d'un dosage des deux paramètres dont 6 patients avec une TNE.

Les TNE étaient localisées au niveau de l'intestin grêle (n = 12), du pancréas (n = 4), du côlon ou du rectum (n = 1) et des bronches (n = 2). Les diagnostics des patients non atteints de TNE étaient majoritairement des troubles digestifs fonctionnels étiquetés syndrome de l'intestin irritable, ainsi que des cancers non TNE et des tumeurs digestives bénignes. Parmi les 19 patients atteints de TNE, 12 patients

(63,2 %) présentaient des métastases au moment du diagnostic.

Dosages biologiques

Les performances analytiques de la sérotonine plaquettaire et du 5-HIAA urinaire sont présentées dans le tableau 2. Le coefficient de variation (CV) de la fidélité intermédiaire était de 2 % pour le CQI niveau bas (moyenne : 608 amol/L) et de 2 % pour le CQI niveau haut (moyenne : 2 115 amol/L) pour la sérotonine. Le CV de la fidélité intermédiaire était de 9,6 % pour le CQI niveau bas (moyenne : 26,5 μmol/L) et de 5 % pour le CQI niveau haut (moyenne : 141 μmol/L) concernant le 5-HIAA.

L'usage des valeurs seuils « fournisseur » à la population de l'étude montrait, pour la sérotonine plaquettaire, une sensibilité de 0,786, une spécificité de 0,793, une VPP de 0,333 et une VPN de 0,966 et pour le 5-HIAA urinaire une sensibilité de 0,636, une spécificité de 0,972, une VPP de 0,636 et une VPN de 0,972. L'utilisation des valeurs seuils « fournisseurs » conduisait à 22 résultats de sérotonine positifs parmi 106 patients non atteints de TNE et à 4 résultats de 5-HIAA négatifs parmi 11 patients atteints de TNE.

Les distributions des valeurs de sérotonine plaquettaire (figure 2A) et de 5-HIAA urinaire (figure 2B) mesurées chez les 165 patients de la cohorte « index » sont représentées sur la figure 2. Les patients atteints de TNE avaient majoritairement

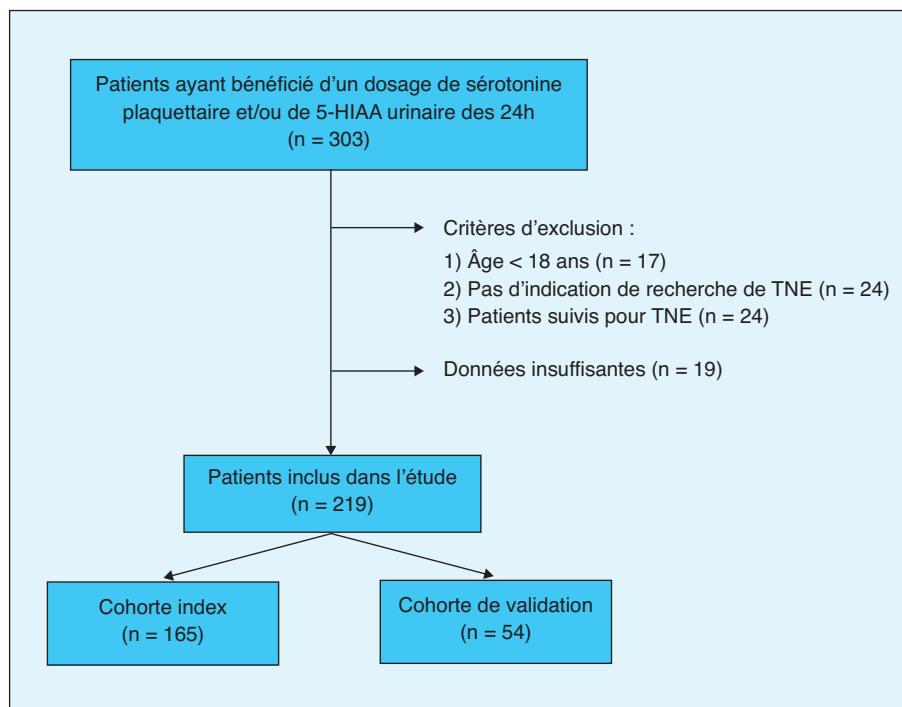


Figure 1. Diagramme de flux de la population de l'étude. 5-HIAA : acide 5-hydroxy-indol-acétique, TNE : tumeur neuroendocrine.

Tableau 1. Caractéristiques des patients.

	Patients (n = 219)	Patients TNE (n = 19)	Patients non TNE (n = 200)
Données démographiques			
Age (années)	57,5 (44,25 - 68)	68 (55 - 79)	57 (44 - 67)
Sexe, homme	104 (47,5 %)	13 (68,4 %)	91 (45,5 %)
Résultats du laboratoire			
Sérotonine	119 (54,3 %)	14 (73,7 %)	105 (52,5 %)
5-HIAA	154 (70,3 %)	11 (57,9 %)	143 (71,5 %)
Sérotonine + 5-HIAA	54 (24,7 %)	6 (31,6 %)	48 (24 %)
Présentation clinique			
Suspicion de syndrome carcinoïde	163 (74,4 %)	13 (68,4 %)	
Masse à l'imagerie	58 (26,5 %)	14 (73,7 %)	
Métastase au diagnostic		12 (63,2 %)	
Diagnostiques			
TNE toutes origines	19 (8,7 %)		
TNE intestin grêle	12 (63,2 %)		
TNE pancréas	4 (21,1 %)		
TNE côlon/rectum	1 (5,3 %)		
TNE bronches	2 (10,5 %)		
Cancers non TNE	33 (15,1 %)		
Tumeurs bénignes	20 (9,1 %)		
Infections	8 (3,7 %)		
Troubles d'origine médicamenteuse	9 (4,1 %)		
Troubles digestifs fonctionnels	74 (33,8 %)		
Autres	56 (25,5 %)		

Données présentées en médiane (intervalle interquartile) ou en nombre (pourcentage), le cas échéant. TNE : tumeur neuroendocrine ; 5-HIAA : acide 5-hydroxy-indol-acétique.

Tableau 2. Répétabilité et fidélité intermédiaire.

Contrôle de qualité interne		Répétabilité			Fidélité intermédiaire		
		Moyenne	ET	CV (%)	Moyenne	ET	CV (%)
Sérotonine (amol/L)	Niveau bas	605	9,7	1,6	608	12,2	2,0
	Niveau haut	2 122	31,8	1,5	2 115	42,3	2,0
5-HIAA (μ mol/L)	Niveau bas	26,8	1,9	7,2	26,5	2,5	9,6
	Niveau haut	139	5,3	3,8	141	7,1	5,0

5-HIAA : acide 5-hydroxy-indol-acétique ; CV : coefficient de variation ; ET : écart-type.

rement des concentrations élevées en sérotonine et 5-HIAA urinaire. Les courbes ROC établies à partir des valeurs de la sérotonine plaquettaire et de 5-HIAA urinaire mesurées dans la cohorte « index », sont présentées sur la *figure 3*. Pour la sérotonine plaquettaire, l'aire sous la courbe (AUC) de la courbe ROC était de 0,86 contre 0,83 pour l'AUC du 5-HIAA urinaire. Il n'y avait pas de différence significative entre les AUC mesurées ($p = 0,868$). La valeur seuil de positivité maximisant l'index de Youden pour la sérotonine plaquettaire a été déterminée à 5,13 amol/plaquette (valeur « fournisseur » : 4,68 amol/plaquette) ; celle du 5-HIAA urinaire était de 3,60 μ mol/mmol de créatinine urinaire (valeur « fournisseur » : 4,54 μ mol/mmol de créatinine urinaire).

La valeur seuil de 5,13 amol/plaquette pour la sérotonine plaquettaire avait une sensibilité de 0,8, une spécificité de 0,875, une VPP de 0,444 et une VPN de 0,972. La valeur seuil de 5-HIAA de 3,6 μ mol/mmol de créatinine urinaire avait une sensibilité de 0,75, une spécificité de 0,944, une VPP de 0,5 et une VPN de 0,981.

Performance des valeurs seuils

Les performances diagnostiques des valeurs seuils « fournisseur » et des valeurs seuils « étude » ont été comparées sur la cohorte « validation » (*tableau 3*). Pour la sérotonine plaquettaire, l'utilisation d'un seuil à 5,13 amol/plaquette

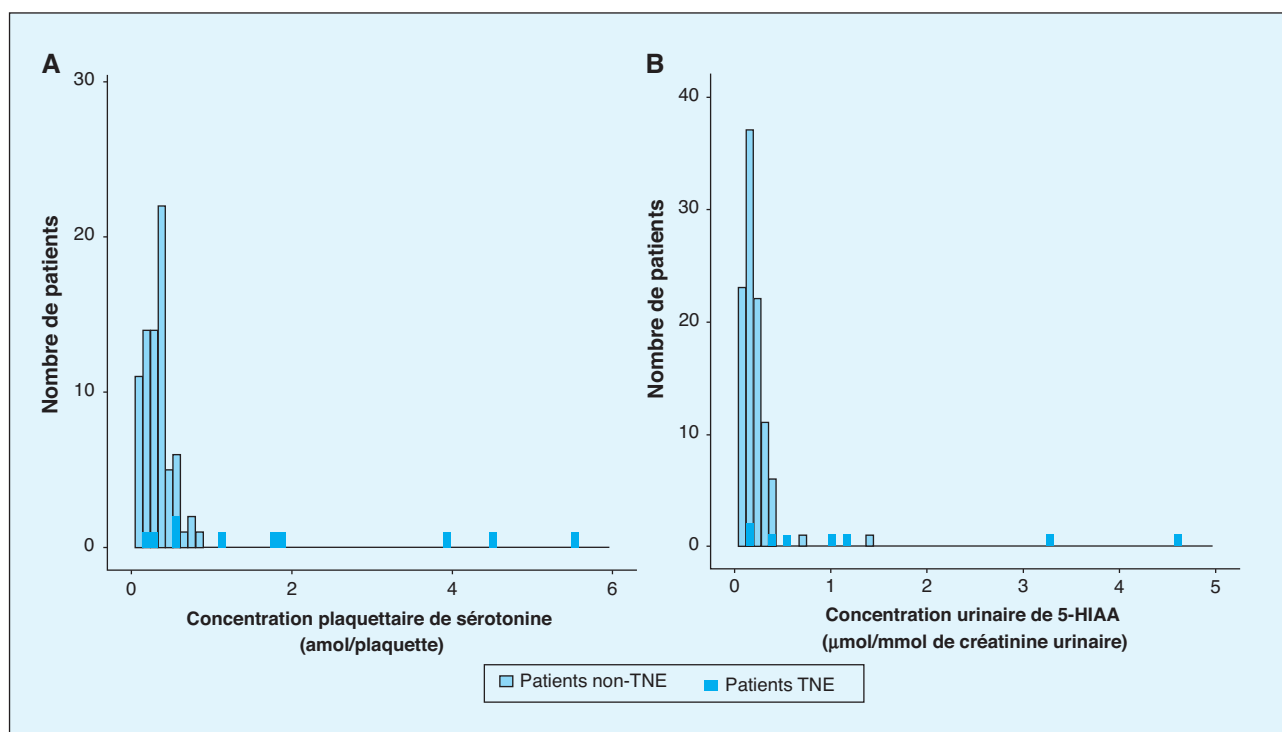


Figure 2. Distribution des valeurs biologiques des patients de la cohorte « index » en fonction du diagnostic de tumeur neuroendocrine, (A) pour la sérotonine plaquettaire (en amol/L), (B) pour le 5-HIAA urinaire sur urines des 24 heures (en µmol/ mmol de créatinine urinaire). 5-HIAA : acide 5-hydroxy-indol-acétique.

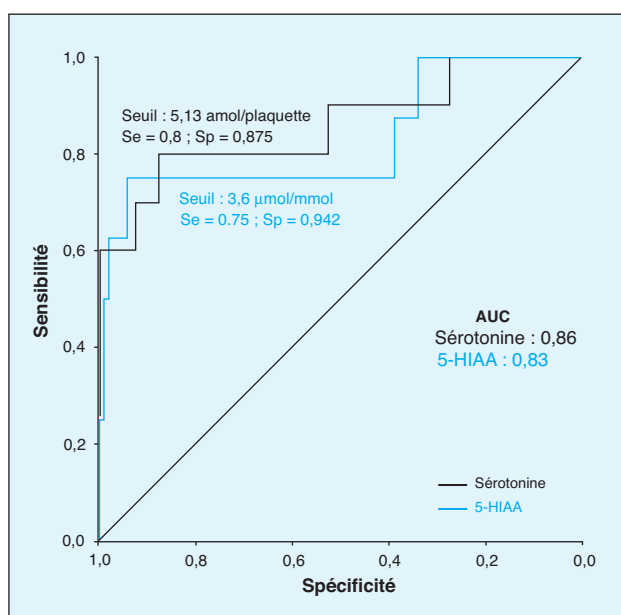


Figure 3. Courbes ROC (*receiver operating characteristics*) et valeurs seuils de la sérotonine plaquettaire et du 5-HIAA urinaire établies à partie de la cohorte « index ». 5-HIAA : acide 5-hydroxy-indol-acétique, AUC : aire sous la courbe, Se : sensibilité, Sp : spécificité.

(valeur étude) par rapport à un seuil de 4,68 amol/plaquette (valeur « fournisseur ») améliorerait la spécificité (0,654 vs 0,533), la VPP (0,25 vs 0,2) et la VPN (0,944 vs 0,933) pour une sensibilité identique (0,75). En ce qui concerne le 5-HIAA urinaire, l'utilisation d'un seuil à 3,6 µmol/mmol de créatinine urinaire, (valeur étude) par rapport à un seuil de 4,54 µmol/mmol de créatinine urinaire (valeur « fournisseur »), améliorerait la sensibilité (1 vs 0,667), la VPP (0,429 vs 0,333) et la VPN (1 vs 0,974) pour une spécificité identique (0,902).

L'utilisation des valeurs seuils « étude » aux 219 patients de la population étudiée montrait 15 résultats faussement positifs et 3 résultats faussement négatifs pour la sérotonine plaquettaire, 6 résultats faussement positifs et 3 résultats faussement négatifs pour le 5-HIAA urinaire. Les quinze résultats faussement positifs pour le dosage de la sérotonine plaquettaire concernaient neuf patients atteints de diarrhées chroniques étiquetées syndrome de l'intestin irritable, deux lymphomes, deux tumeurs bénignes, une diarrhée infectieuse et un patient atteint de malaises vagues à répétition sans étiologie retrouvée. Les trois résultats faussement négatifs pour la sérotonine concernaient deux patients atteints de TNE du grêle et un patient atteint de TNE du pancréas. Les six résultats faussement positifs pour le dosage du 5-HIAA urinaire concernaient deux patients atteints de diarrhées chroniques, un cancer pulmonaire, un

cancer ovarien, un mélanome métastatique et une tumeur digestive bénigne. Les trois résultats faussement négatifs pour le 5-HIAA concernaient deux patients atteints de TNE du grêle et un de TNE du pancréas, tous différents des patients précédents. En effet, lorsque le dosage des deux marqueurs a été réalisé conjointement (4 patients sur 6) le résultat faussement négatif pour l'un des marqueurs était rectifié par un résultat positif pour l'autre.

Discussion

Les tumeurs neuroendocrines digestives ont une incidence faible mais sont complexes à diagnostiquer et peuvent être suspectées chez de nombreux patients (plus de 200 en 10 ans au CHU de Tours). La recherche biologique d'une hyperproduction tumorale de sérotonine est un examen clé dans le diagnostic de TNE [12]. La sérotonine et son principal métabolite, le 5-HIAA, peuvent être dosés par de nombreuses méthodes dont la plus utilisée en routine hospitalière est l'HPLC avec détection électrochimique [13]. La sérotonine plaquettaire a montré de meilleures performances que la sérotonine urinaire dans la recherche diagnostique de TNE [14] et est moins sensible à l'alimentation du patient que la sérotonine plasmatique [8]. Ainsi, le dosage de la sérotonine plaquettaire sur plasma riche en plaquette et le 5-HIAA urinaire sur urines de 24 heures font partie des examens biologiques de première intention à la recherche d'une TNE [4].

Si ces marqueurs biochimiques sont d'une grande aide dans le diagnostic et le suivi des TNE, un manque de fiabilité des valeurs de référence a pu être observé dans notre laboratoire par un nombre élevé de faux positifs pour la sérotonine et de faux négatifs pour le 5-HIAA. Ces résultats peuvent être responsables de prescriptions d'examens

non indispensables chez des sujets non atteints de TNE et sont susceptibles de retarder le diagnostic de patients présentant une TNE. Cette étude permet d'établir les valeurs seuils suivantes pour la recherche de TNE chez les patients adultes : 5,13 amol/plaquette pour la sérotonine plaquettaire et 3,6 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de créatinine urinaire pour le 5-HIAA urinaire. En revanche, l'étude ne présume pas des valeurs à utiliser lors du suivi.

Nous devons souligner que la méthodologie utilisée, basée sur 2 cohortes pour établir les valeurs de référence et pour les valider, est la stratégie la plus robuste pour établir des valeurs de référence fiables [15]. La population de l'étude n'était pas composée de sujets exempts de toute pathologie, comme recommandé pour établir les valeurs de référence [16], mais ces sujets correspondaient précisément à la population chez qui les dosages biochimiques doivent permettre de détecter ou d'exclure une TNE. Le choix de cette population pour établir les valeurs seuils était motivé par le fait que la sérotoninémie est notablement augmentée chez les patients qui présentent une diarrhée [7].

Par rapport aux valeurs « fournisseur », les valeurs de référence « étude » de la sérotonine plaquettaire amélioraient, sur la cohorte « validation », la spécificité du dosage, la VPP et la VPN, pour une sensibilité identique. L'utilisation de ces valeurs de référence pourrait permettre de diminuer le nombre de dosages rendus positifs à tort et ainsi limiter la prescription d'explorations non indispensables. L'étude a permis d'établir les valeurs de référence du 5-HIAA urinaire des 24 heures en $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de créatinine urinaire quand le fournisseur ne propose que des valeurs de référence en $\mu\text{mol}/\text{L}$. Ces valeurs amélioraient la sensibilité, la VPP et la VPN, pour une spécificité identique et pourrait éviter de méconnaître l'existence d'une TNE.

La population atteinte de TNE était constituée d'une majorité de sujets d'âge mûr et de localisations tumorales variées,

Tableau 3. Résultats de l'analyse sur la cohorte « index » et la cohorte « validation ».

	Cohorte « index »		Cohorte « validation »			
	Sérotonine plaquettaire (n = 85)	5-HIAA urinaire (n = 109)	Sérotonine plaquettaire (n = 30)		5-HIAA urinaire (n = 44)	
Patients TNE (nombre)	10	8	4		3	
Patients non TNE (nombre)	80	103	26		41	
AUC	0,86	0,83				
			Valeur fournisseur	Valeur étude	Valeur fournisseur	Valeur étude
Valeur seuil	5,13	3,60	4,68	5,13	4,54	3,6
Sensibilité (%)	80,0	75,0	75,0	75,0	66,7	100
Spécificité (%)	87,5	94,4	53,9	65,4	90,2	90,2
VPP (%)	44,4	50,0	20,0	25,0	33,3	42,9
VPN (%)	97,2	98,1	93,3	94,44	97,4	100

5-HIAA : acide 5 hydroxy indol acétiques ; AUC : aire sous la courbe ; TNE : tumeur neuroendocrine ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive.

conformément à la population de l'étude d'Onaitis *et al.* [17]. Les six résultats négatifs observés avec les valeurs seuils « étude », malgré l'existence d'une TNE (3 pour la sérotonine, 3 pour le 5-HIAA), étaient positifs pour le second marqueur lorsque celui-ci était dosé (4/6). Sabol *et al.* [18] ont montré qu'un polymorphisme au niveau du promoteur de la mono amine oxydase A, l'enzyme principale du catabolisme de la sérotonine en 5-HIAA, est responsable de grandes variations de la production de cette enzyme. Cet élément pourrait expliquer qu'une surproduction de sérotonine par la tumeur puisse se traduire, en fonction des individus, par une sérotoninémie fortement augmentée (faible expression de mono amine oxydase A) et un 5-HIAA plus faible, ou par un 5-HIAA urinaire fortement augmenté (forte expression de mono amine oxydase A) et une sérotoninémie dans les limites de la normale. Les vingt-et-un résultats positifs en l'absence de TNE (15 pour la sérotonine, 6 pour le 5-HIAA) pourraient trouver leur origine dans la complexité à imposer aux patients un respect strict des conditions pré-analytiques concernant le régime alimentaire.

Conclusion

Notre étude propose les valeurs de référence suivantes pour le diagnostic biologique de TNE : < 5,13 amol/plaquette pour la sérotonine plaquettaire et < 4,20 μ mol/mmol de créatinine urinaire pour le 5-HIAA urinaire sur urines des 24 heures. Ces valeurs nous semblent améliorer les caractéristiques diagnostiques des tests et donc permettre un meilleur diagnostic des tumeurs neuroendocrines. Néanmoins, cette étude mériterait idéalement d'être réalisée sur sujet sain. Cette étude permet également à notre laboratoire d'établir les valeurs de référence pour ces deux examens dans le cadre de l'accréditation selon la norme ISO 15189.

Remerciements. Les auteurs remercient les techniciens du service de biochimie du CHU de Tours pour leur aide et en particulier le secteur des HPLC.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Yao J, Manal H, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares J, *et al.* One hundred years after 'carcinoid': epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 3063-72.
2. Eriksson B, Klöppel G, Krenning E, Ahlman H, Plöckinger U, Wiedenmann B, *et al.* Consensus guidelines for the management of patients

with digestive neuroendocrine tumors—well-differentiated jejunal-ileal tumor/carcinoma. *Neuroendocrinology* 2008 ; 87 : 8-19.

3. Modlin I, Sandor A. An Analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer* 1997 ; 79 : 813-29.
4. Oberg K, Couvelard A, Delle Fave G, Gross D, Grossman A, Jensen RT, *et al.* ENETS consensus guidelines for standard of care in neuroendocrine tumours : biochemical markers. *Neuroendocrinology* 2017 ; 105 : 201-11.
5. d'Herbomez M, Coppin L, Bauters C, Rouaix-Emery N, Carnaille B, Do Cao C. Biomarkers of neuroendocrine tumors. *Ann Bio Clin (Paris)* 2016 ; 74 : 669-79.
6. Flachaire E, Beney C, Berthier A, Salandre J, Quincy C, Renaud B. Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* 1990 ; 36 : 2117-20.
7. Atkinson W, Lockhart S, Whorwell PJ, Keevil B, Houghton LA. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 34-43.
8. Kema I, Schellings A, Meiborg G, Hoppenbrouwers C, Muskiet F. Influence of a serotonin- and dopamine-rich diet on platelet serotonin content and urinary excretion of biogenic amines and their metabolites. *Clin Chem* 1992 ; 38 : 1730-6.
9. Monaghan PJ, Brown HA, Houghton LA, Keevil BG. Measurement of serotonin in platelet depleted plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009 ; 22 : 2163-7.
10. Corcuff JB, Chardon L, El Hajji Ridah I, Brossaud J. Urinary sampling for 5HIAA and metanephrines determination : revisiting the recommendations. *Endocr Connect* 2017 ; 6 : R87-98.
11. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, *et al.* pROC : an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011 ; 12 : 77.
12. O'Toole D, Grossman A, Gross A, Delle Fave G, Barkmanova J, O'Connor J, *et al.* ENETS consensus guidelines for the standards of care in neuroendocrine tumors : biochemical markers. *Neuroendocrinology* 2009 ; 90 : 194-202.
13. Brand T, Anderson G. The measurement of platelet-poor plasma serotonin : a systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem* 2011 ; 57 : 1376-86.
14. Meijer W, Kema I, Volmer M, Willemsse P, De Vries E. Discriminating capacity of indole markers in the diagnosis of carcinoid tumors. *Clin Chem* 2000 ; 46 : 1588-96.
15. Steyerberg EW. *A practical approach to development, validation and updating*. New York : Springer, 2009.
16. Grasbeck R. The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* 2004 ; 42 : 692-7.
17. Onaitis M, Kirshbom P, Hayward T, Quayle F, Feldman J, Seigler F, *et al.* Gastrointestinal carcinoids : characterization by site of origin and hormone production. *Ann Surg* 2000 ; 232 : 549-56.
18. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 1998 ; 103(3) : 273-9.