

NSE: Lésions cérébrales et hémolyse

A. Frikha, D. Fage, F. Wolff, F. Cotton

Chimie médicale, LHUB-ULB, site Anderlecht



PLAN

I. INTRODUCTION

II. INTÉRÊTS DE DOSAGE

III. MÉTHODES DE DOSAGE

IV. IMPACT DE L'HEMOLYSE

V. METHODE DE CORRECTION

VI. CONCLUSION

I. Introduction

- Enolase : **enzyme de la voie glycolytique**, PM voisin de 80 kDa.
- Isoformes dimériques composées de trois sous-unités distinctes :
et .
 - ✓ , émolase non-neuronale (NNE): foie, cerveau, rein, rate, tissu adipeux
 - ✓ , émolase spécifique du muscle (MSE)
 - ✓ et , **émolase neurospécifique** (NSE) ou **-émolase**: haute concentration dans les **neurones** et les **cellules neuroendocrines** ainsi que dans **les tumeurs d'origine neuroendocrinienne**.
 - ✓ Isoforme aussi présent dans **les érythrocytes** et **les plaquettes**

PLAN



Hôpital
Erasme



I. INTRODUCTION

II. INTÉRÊTS DE DOSAGE

III. MÉTHODES DE DOSAGE

IV. IMPACT DE L'HEMOLYSE

V. METHODE DE CORRECTION

VI. CONCLUSION

II. Intérêts de dosage

- Utilisée comme biomarqueur dans
 - ❑ Diagnostic, pronostic et suivi thérapeutique des **tumeurs neuroendocrines (TNE)** (cancer bronchopulmonaire à petites cellules, neuroblastome, carcinome médullaire de la thyroïde, ò)

II. Intérêts de dosage

✓ *Cancers bronchiques à petites cellules*

- Taux élevé dans ¹ 80% des cas
- Aide au diagnostic histologique différentiel entre SCLC et NSCLC
- Reflète le niveau d'extension de la maladie

	Localisés	Disséminés	p
Carney et al	15/ 38	49/ 56	< 0.025
Cooper et al	25/ 38	34/ 39	
Escher et al	34/ 48	54/ 55	<0.001
Johnson et al	23/ 39	45/ 54	<0.001
Milleron et al	13/ 31	28/ 40	<0.01

Nombre de patients avec valeur NSE initiale élevée

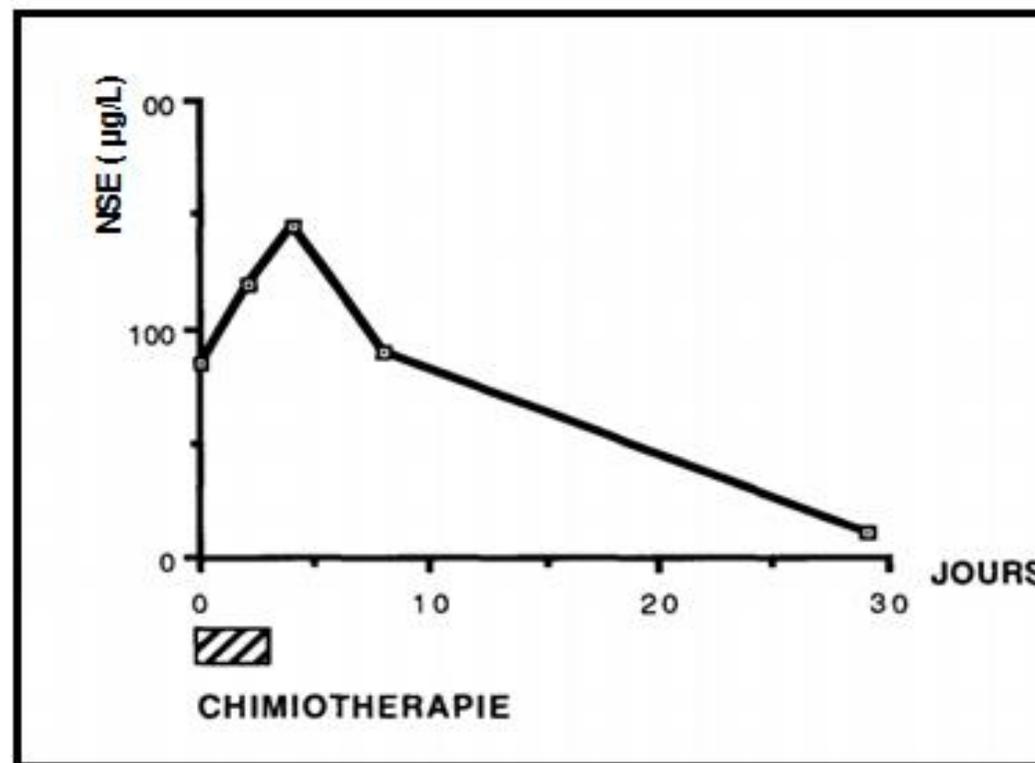
(1) Harding M et al. Br J Cancer. 1990

(2) Jorgensen et al. Br J Cancer. 1996

(3) Quiox E et al. Lung Cancer. 2000

II. Intérêts de dosage

- ✓ *Cancers bronchiques à petites cellules*
- Suivi thérapeutique:



II. Intérêts de dosage

✓ *Neuroblastome*

- Bonne corrélation entre le taux de la NSE et **le stade de la maladie.**
- Une normalisation des concentrations est en corrélation avec **une rémission complète** et **la survie du patient.**

II. Intérêts de dosage

- Evaluation du pronostic chez les patients en **coma post anoxique**:
 - ✓ Élément **prédictif de pronostic** validé par l'**Académie Américaine de Neurologie**

II. Intérêts de dosage

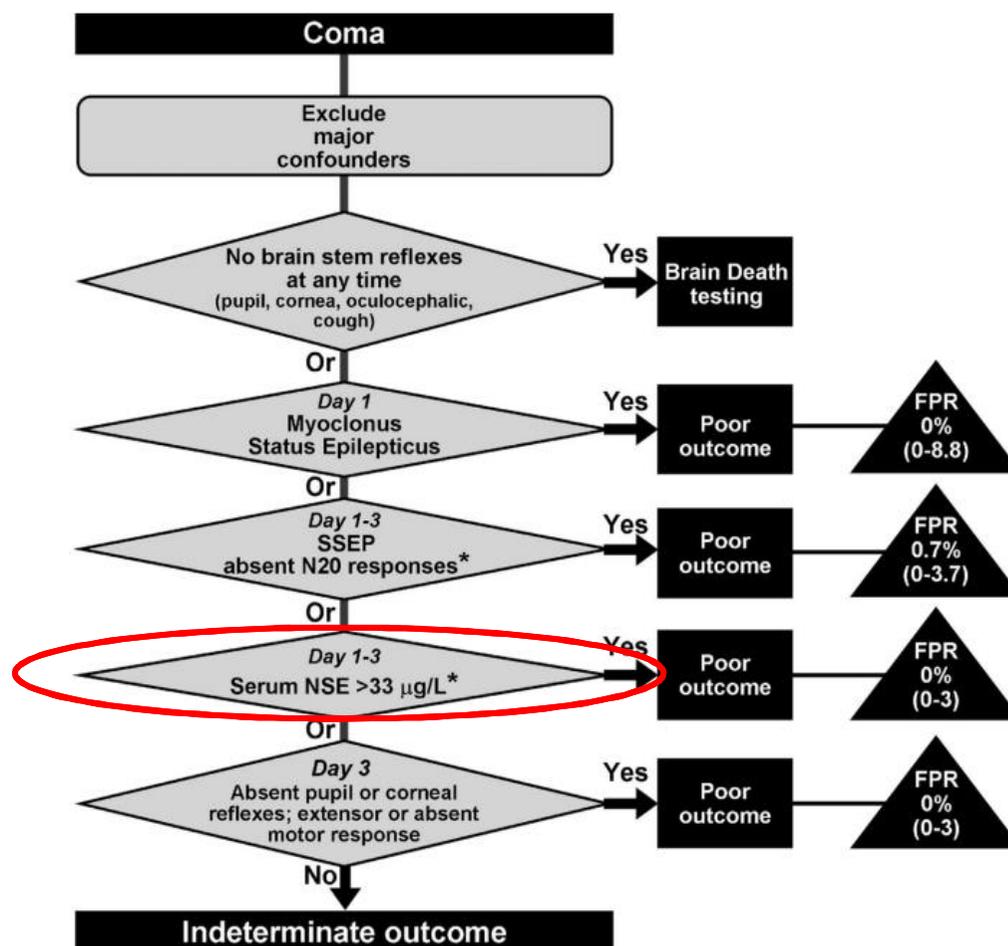
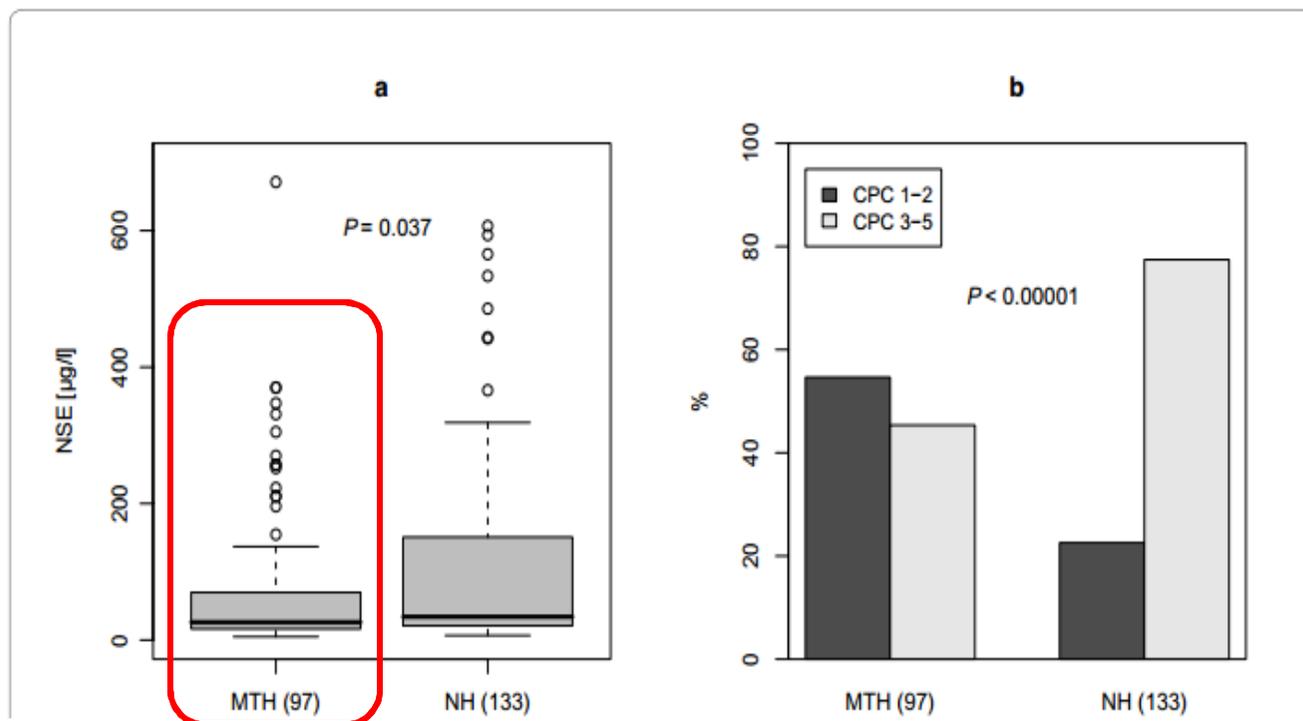


Figure. Decision algorithm for use in prognostication of comatose survivors after cardiopulmonary resuscitation. The numbers in the triangles are percentages. The numbers in parentheses are exact 95% CIs. Major confounders could include the use or prior use of sedatives or neuromuscular blocking agents, induced hypothermia therapy, presence of organ failure (e.g., acute renal or liver failure) or shock (e.g., cardiogenic shock requiring inotropes). Studies in comatose patients after CPR have not systematically addressed the impact of these factors on the reliability of clinical neurologic examination and tests. Therefore, these confounding factors potentially could diminish the prognostic accuracy of this algorithm. *These test results may not be available on a timely basis. Serum NSE testing may not be sufficiently standardized.

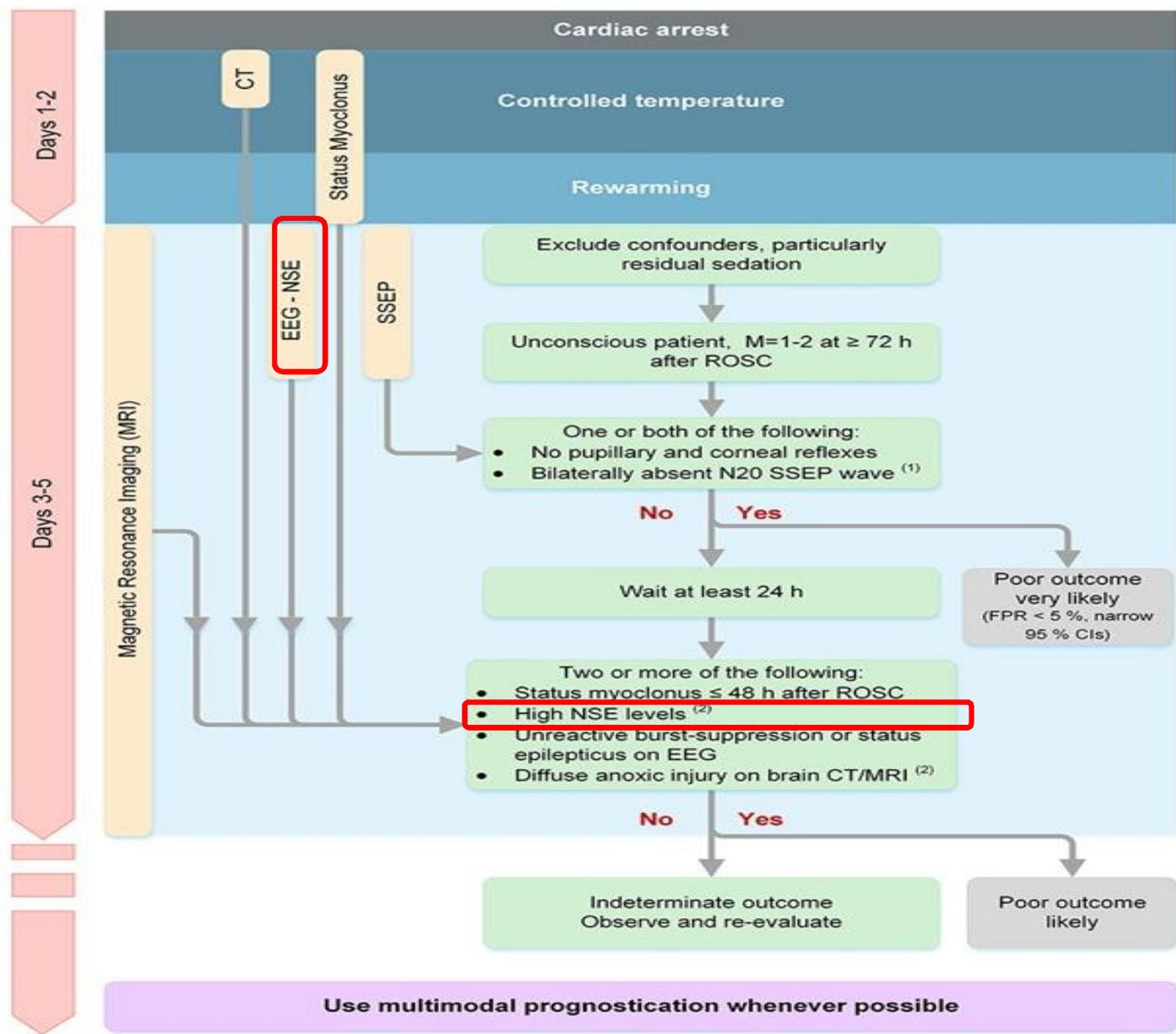
II. Intérêts de dosage

- Dès 2003: recours systématique à une nouvelle mesure neuroprotectrice

↳ Hypothermie thérapeutique (HT)



NSE serum levels (a) and neurological outcome (b) of patients treated with mild HT and non HT group



(1) At ≥ 24 h after ROSC in patients not treated with targeted temperature
 (2) See text for details.

(1) Sandroni.C et al. Resuscitation.2014
 (2) Nolan.J et al. Resuscitation Council (UK) Guidelines. 2015.

II. Intérêts de dosage

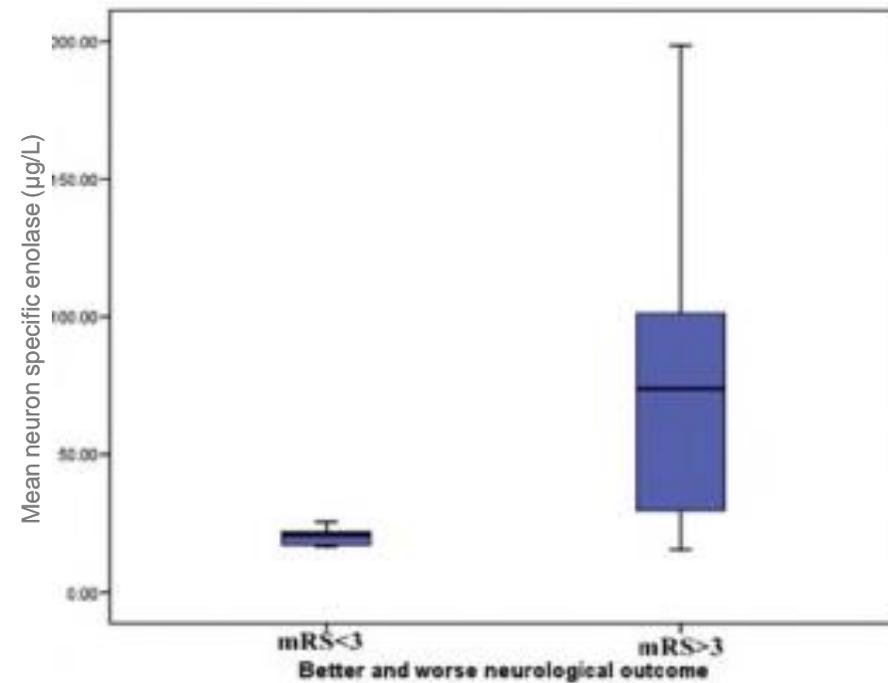
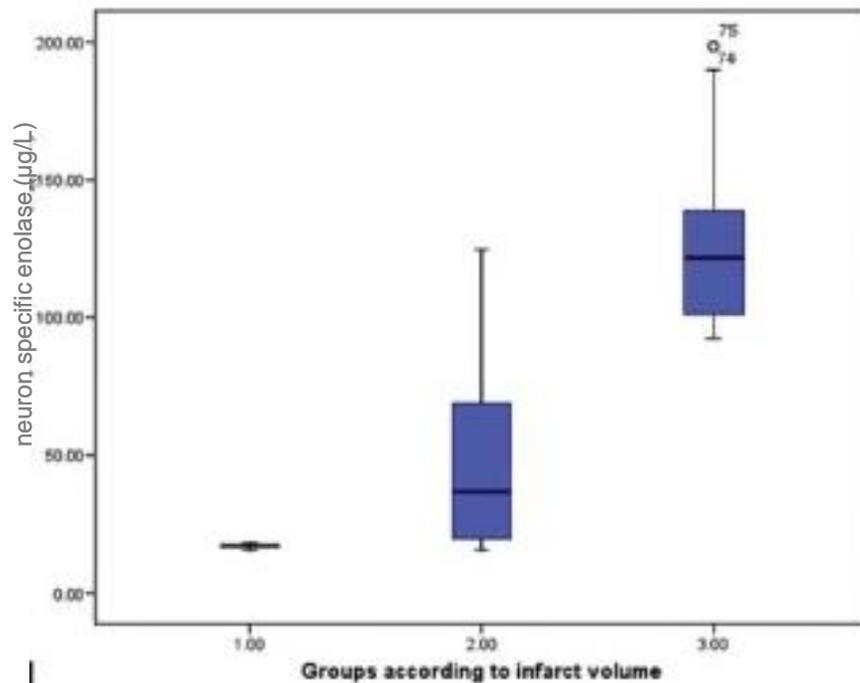
Variabilité des seuils d'une étude à une autre liée à:

- ✓ Méthodes / analyseurs différents
- ✓ Source extraneuronale de NSE (hémolyse, tumeurs neuroendocrines)
- ✓ Influence des thérapeutiques neuroprotectrices utilisées (avec ou sans HT)

Valeur seuil de NSE ($\mu\text{g/L}$)	Valeur prédictive d'un pronostic défavorable (CPC 4-5)	
	Normothermie	Hypothermie
Zandenbergen et al. 2006	> 33 $\mu\text{g/L}$ à H72 (Spécificité: 97 à 100%)	
Zingler et al. 2003	\sim 43 $\mu\text{g/L}$ à H48 (Spécificité: 100 %, sensibilité: 90,9%)	
Reisinger et al. 2007		> 80 $\mu\text{g/L}$ à H72
Steffen IG et al. 2010	> 26,9 $\mu\text{g/L}$ à H72 (Spécificité: 100 %)	> 78,9 $\mu\text{g/L}$ à H72

II. Intérêts de dosage

- ❑ Evaluation de la atteinte neuronale au cours des accidents vasculaires cérébraux:



II. Intérêts de dosage

❑ Traumatisme crânien:

- ✓ Des taux élevés de NSE sont corrélés à l'intensité de la réponse inflammatoire au cours du traumatisme crânien grave.

II. Intérêts de dosage

- La concentration de la NSE dans le LCR:
 - ✓ peut orienter le diagnostic dans certaines atteintes cérébrales avec ou sans dommages cellulaires
 - ✓ le dépistage précoce de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

PLAN



Hôpital
Erasme



I. INTRODUCTION

II. INTÉRÊTS DE DOSAGE

III. MÉTHODES DE DOSAGE

IV. IMPACT DE L'HEMOLYSE

V. METHODE DE CORRECTION

VI. CONCLUSION

III. Méthodes de dosage

- Méthodes disponibles les plus utilisées: **immunologiques** de type RIA (radioimmunoassay), ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay) et ELISA (electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay)

Table 2: Discrimination of methods

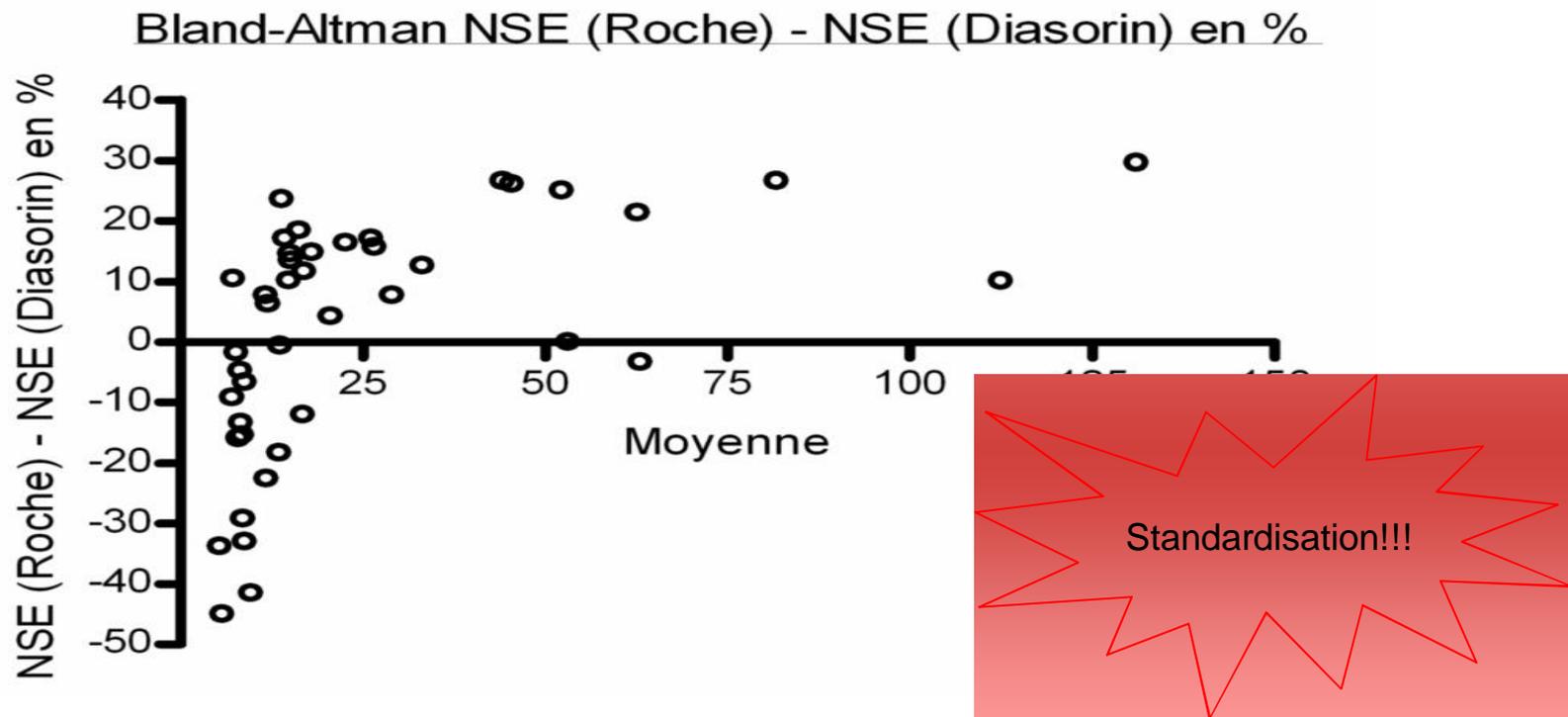
Method n = 224	Median µg/l	Cutoff ¹ µg/l	Results above cutoff, %	Median/cutoff ratio
B.R.A.H.M.S.	12.1	12.5	46.0	0.97
CIS	12.6	12	54.0	1.05
DiaSorin	12.8	12.5	51.8	1.02
DRG	7.6	13	23.7	0.58
Immunotech	10.9	13.4	35.3	0.81
PerkinElmer	11.8	12.5	47.3	0.95
Roche	11.6	16.3	35.3	0.71

n = Number of samples.

¹ Cutoff values stated by manufacturers' protocols.

III. Méthodes de dosage

- ✓ Corrélation entre Elecsys® (Roche Diagnostics) et LIAISON® (Diasorin)
(n = 40)



PLAN

I. INTRODUCTION

II. INTÉRÊTS DE DOSAGE

III. MÉTHODES DE DOSAGE

IV. IMPACT DE LA HÉMOLYSE

V. METHODE DE CORRECTION

VI. CONCLUSION

IV. Impact de l'hémolyse

- Les anticorps utilisés lors du dosage de la NSE sont **spécifiques de la sous-unité** \implies ils reconnaissent les deux isoformes \implies dosage très sensible à la **présence d'éléments cellulaires** (plaquettes, globules rouges) et à **l'hémolyse**.
- L'hémolyse peut se produire in vitro (phase préanalytique) ou in vivo (induite par l'hypothermie thérapeutique)

PLAN



Hôpital
Erasme



I. INTRODUCTION

II. INTÉRÊTS DE DOSAGE

III. MÉTHODES DE DOSAGE

IV. IMPACT DE L'HEMOLYSE

V. METHODE DE CORRECTION

VI. CONCLUSION

V. Méthode de correction

Exactitude des valeurs de NSE

Réduction du taux de rejet des échantillons hémolysés



Développement et validation d'une **méthode de correction** de la concentration de NSE sur les sérums hémolysés

1. Objectifs de l'étude

- a. Vérifier la linéarité de la relation NSE : f (index d'hémolyse)
- b. Comparer deux méthodes de correction :
 - « Reference method »: Méthode publiée par une équipe américaine basée sur l'équation suivante:

$$\text{NSE}_{\text{corr}} = \text{NSE}_{\text{mes}} \cdot (\text{Hb}_{\text{sérum}})^* (\text{NSE}_{\text{GR/Hb}}) + 0,0844 (\text{Hb}_{\text{sérum}}) + 1,1$$

- « Home made method »

a. Vérification de la linéarité de la relation NSE : f (IH)



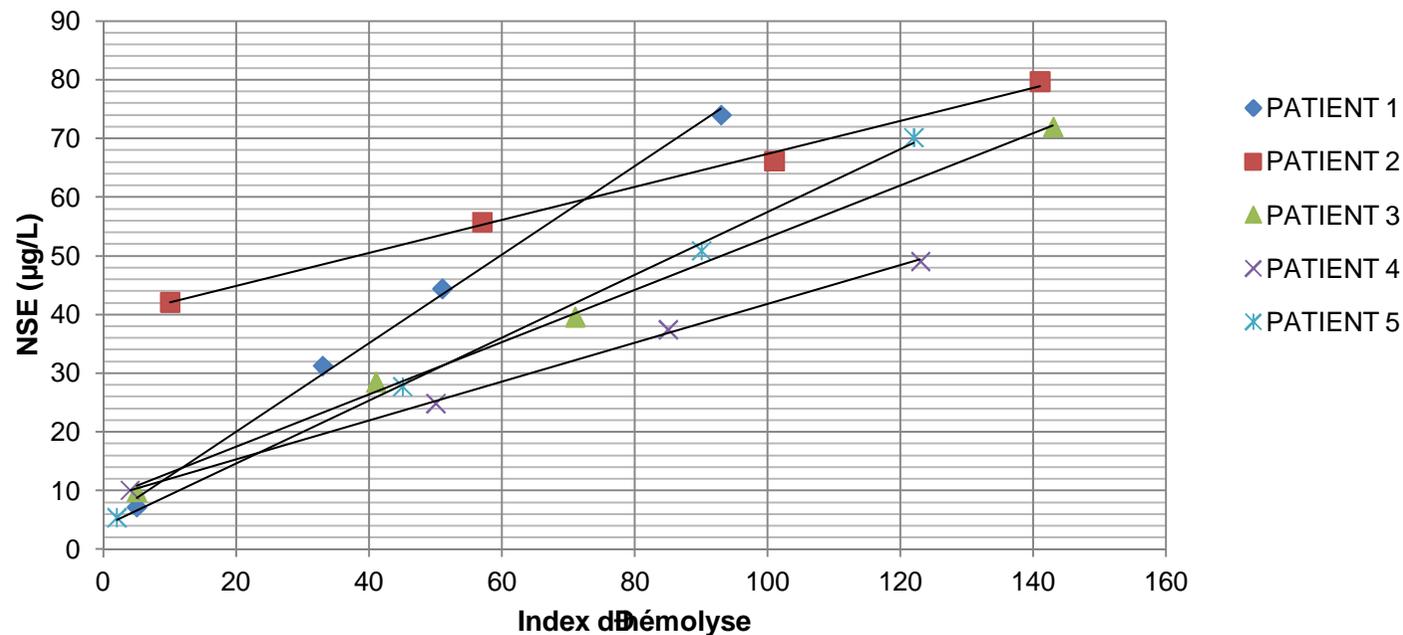
Hôpital
Erasme



- ✓ 5 échantillons (sur tubes secs avec gel séparateur)
- ✓ Créer artificiellement 3 niveaux de hémolyse
- ✓ Mesurer IdH et la NSE sur chaque échantillon

a. Vérification de la linéarité de la relation NSE : f (IH)

- ✓ La relation NSE : f(index hémolytique) est bien linéaire
 - ✓ Variabilité inter-individuelle du taux de NSE intra-érythrocytaire
- ➡ Une formule générale basée sur l'IH initial ne peut pas être appliquée



b. Comparaison des deux méthodes de correction

❑ Collecte des échantillons (30 patients)



Doser la NSE (NSE₀: valeur de référence)
et déterminer IqH (IH₀)

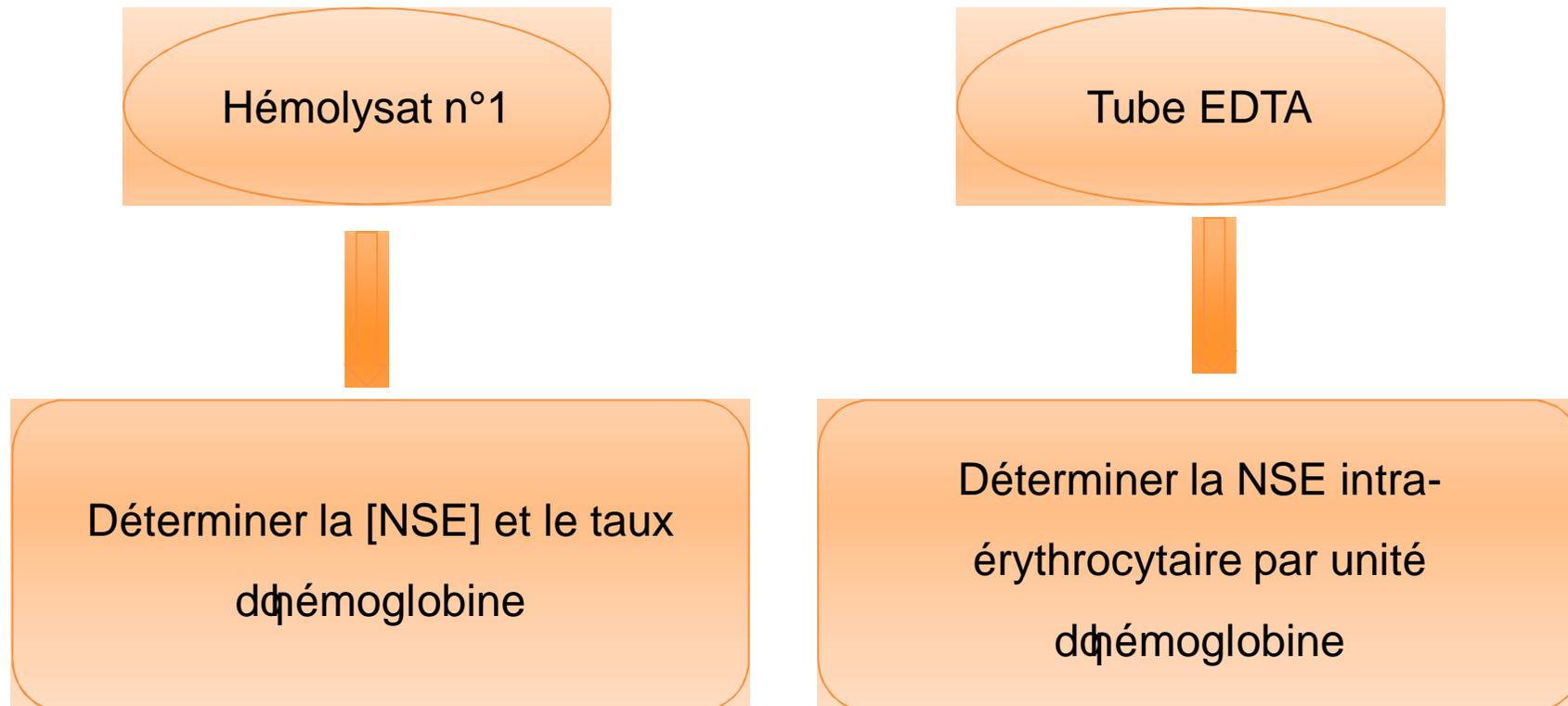
Déterminer la NSE intra-érythrocytaire +
IH dans le lysat de GR

Préparer 2 hémolysats (IH différents)
Hémolysat n°1: utilisé pour la « Home made method »
et la « reference method »
Hémolysat n°2: utilisé pour la « Home made method »

Déterminer la NSE + IH de chaque hémolysat

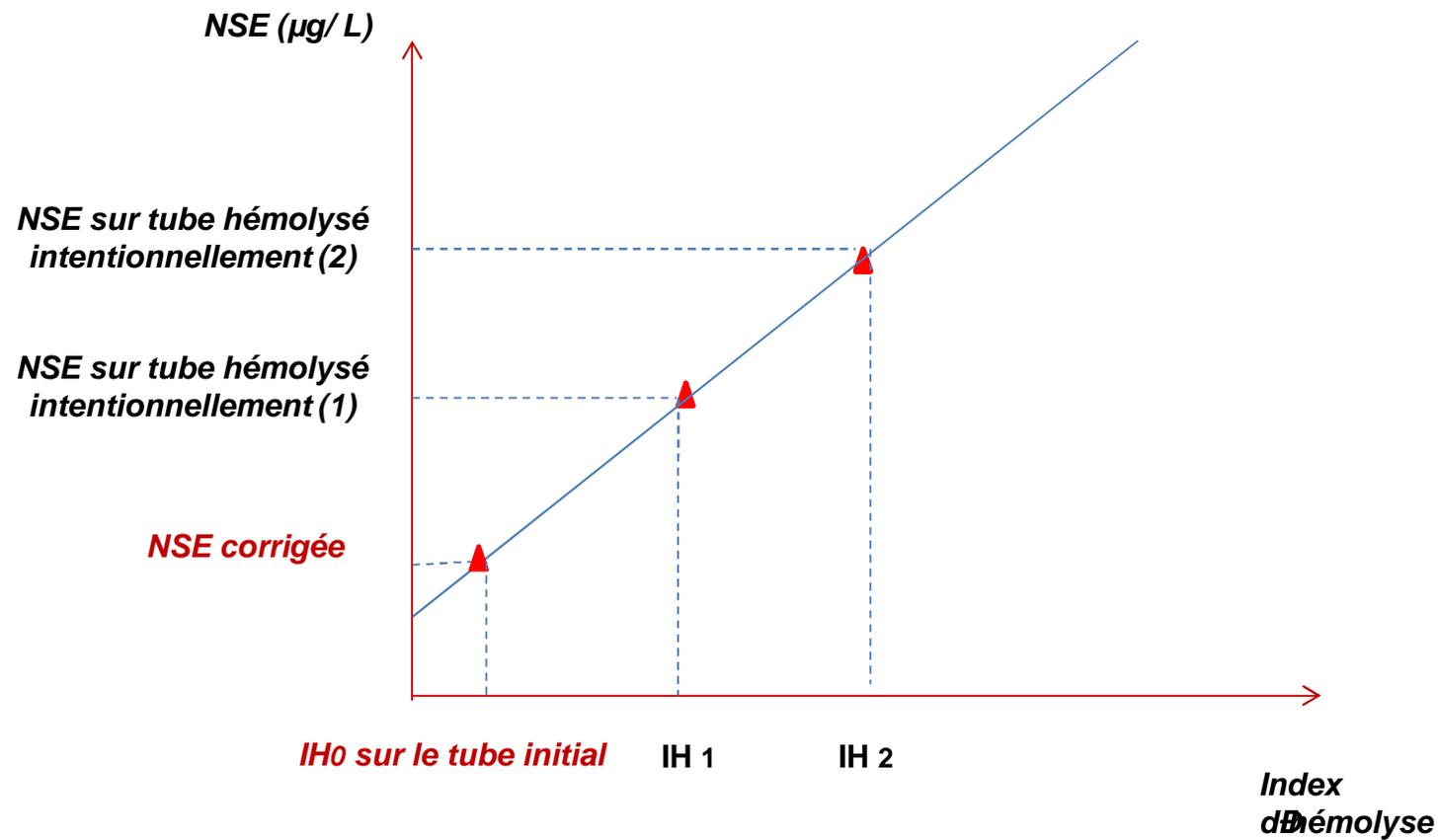
b. Comparaison des deux méthodes de correction

□ Principe de la « Reference method »



b. Comparaison des deux méthodes de correction

□ Principe de « Home made method »



b. Comparaison des deux méthodes de correction

□ Matériel et méthodes de dosage

- ✓ Dosage de la NSE: ECL sur le Modular E170 (Roche Diagnostics)
- ✓ Détermination de l'index hémolytique: Modular P800
- ✓ Détermination du taux de Hémoglobine: par calcul

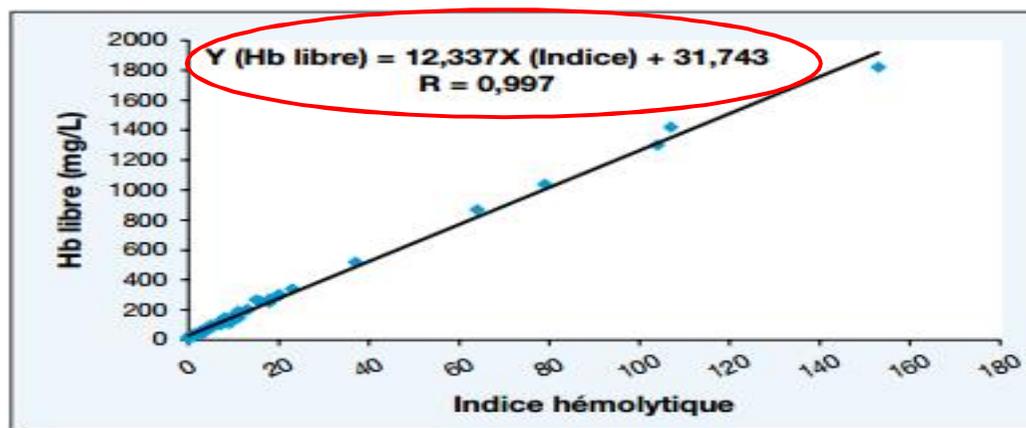


Figure 1. Comparaison entre le dosage de hémoglobine libre par spectrophotométrie (Beckman Coulter[®]) et l'index hémolytique mesuré sur le Modular[®] (n = 42).

b. Comparaison des deux méthodes de correction



Hôpital
Erasmus



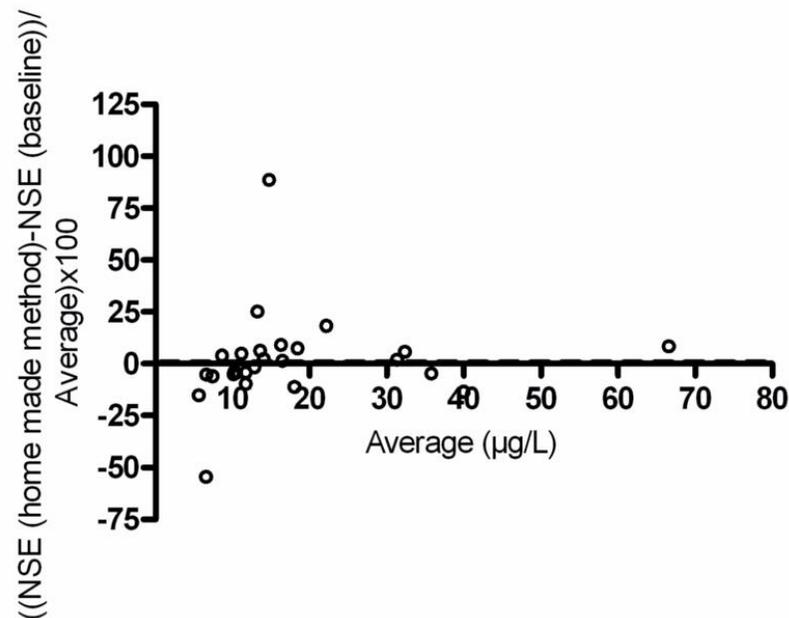
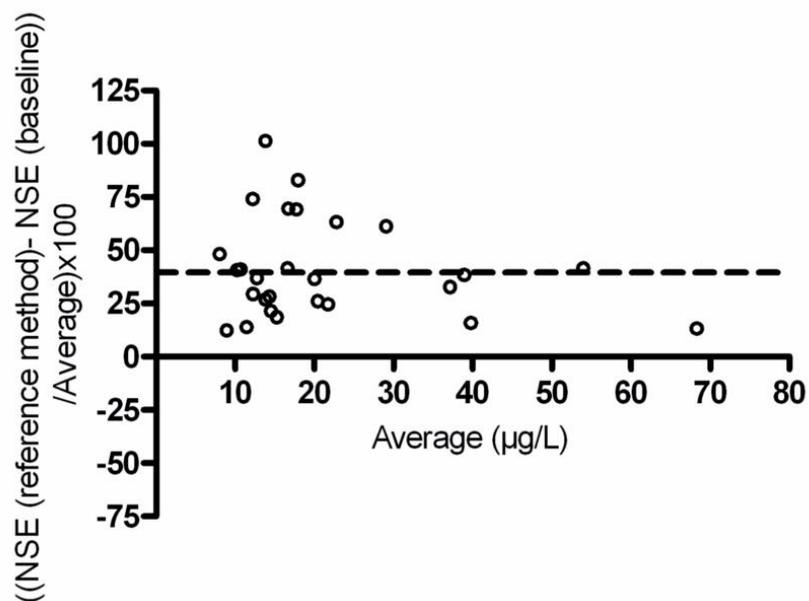
□ Interprétation des résultats

✓ L'interprétation des résultats est basée sur les déviations autorisées par l'institut de santé publique (ISP)

Paramètre	Concentration seuil	Déviati on relative autorisée à partir d'une concentration médiane - concentration seuil	Déviati on absolue autorisée à partir d'une concentration médiane < concentration seuil
NSE	15,8 µg/L	17 %	± 2,69 µg/L

b. Comparaison des deux méthodes de correction

□ Résultats



Reference method

Home made methode

SD of bias

23.2

22.25

b. Comparaison des deux méthodes de correction



Hôpital
Erasme



□ Résultats

- En tenant compte de la déviation autorisée par IdSP, on a trouvé que la « home made method » a permis de corriger **79%** des valeurs de la NSE dans les échantillons intentionnellement hémolysés **©17%** avec la « reference method »

2. Avantages de « Home made method »

- Méthode plus simple: un seul tube sec avec gel séparateur est nécessaire
- Méthode plus rapide: Réduction du temps de la manipulation
- Intérêt clinique:
 - ✓ Meilleur résultat, plus proche des valeurs vraies de la NSE 
meilleure prise en charge du patient
 - ✓ Éviter le repiquage des patients (pédiatrie ++)

3. Application pratique de la nouvelle méthode de correction

- ❑ Toute demande de la NSE doit être accompagnée d'un tube sec sur gel séparateur
- ❑ Tout résultat normal de la NSE peut être validé sans étape supplémentaire
- ❑ Tout résultat pathologique ($> 16,3 \mu\text{g/L}$) doit être confronté avec la valeur de I_{qH}

A partir de quel I_H doit on déclencher une procédure de correction?

3. Application pratique de la nouvelle méthode de correction

On a comparé les valeurs de la NSE aux différents IH: 0, 5, 10 et 15:

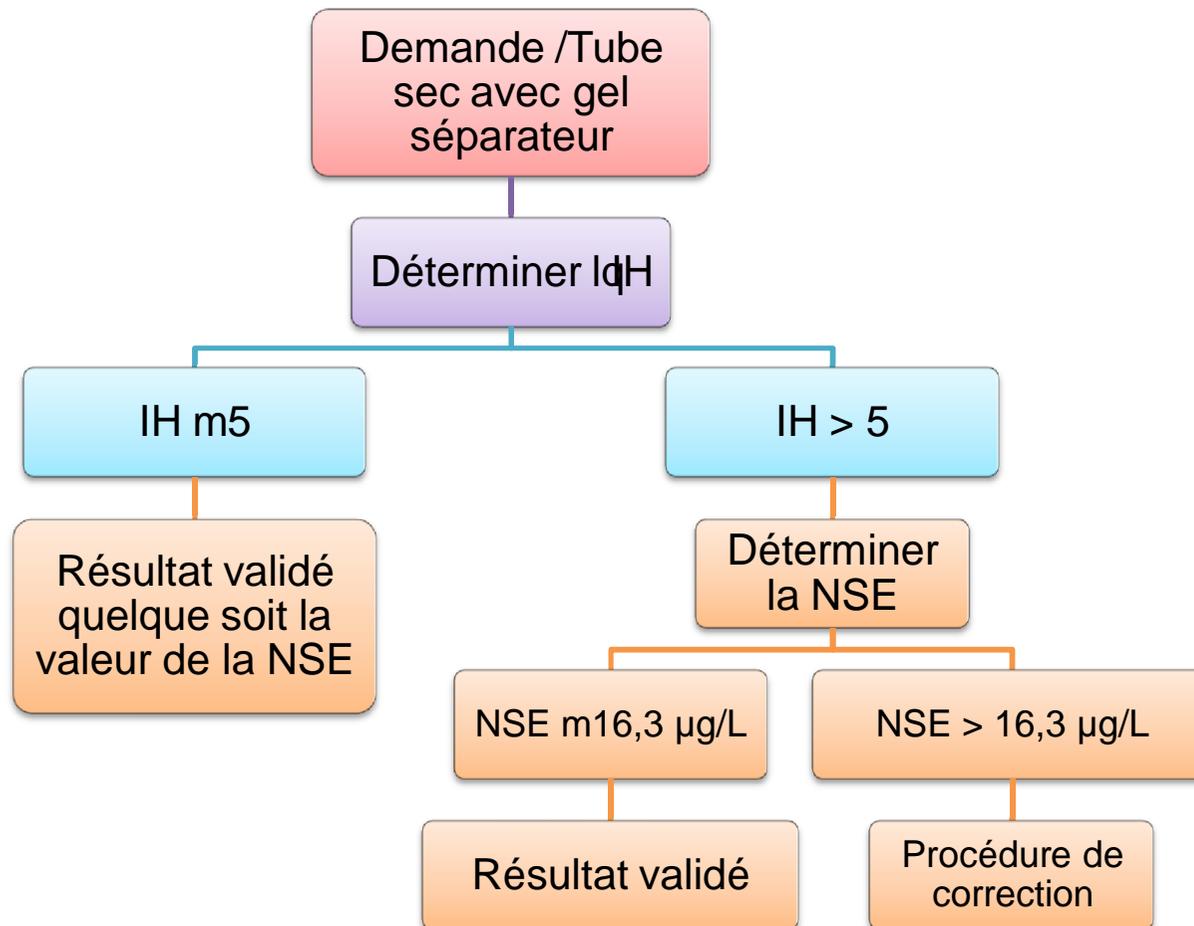
- ✓ Pas de différence significative entre IH 0 et IH 5 dans 83,3 % des cas
- ✓ Pas de différence significative entre IH 0 et IH 10 dans 20 % des cas



On fixe alors un IH seuil égal à 5

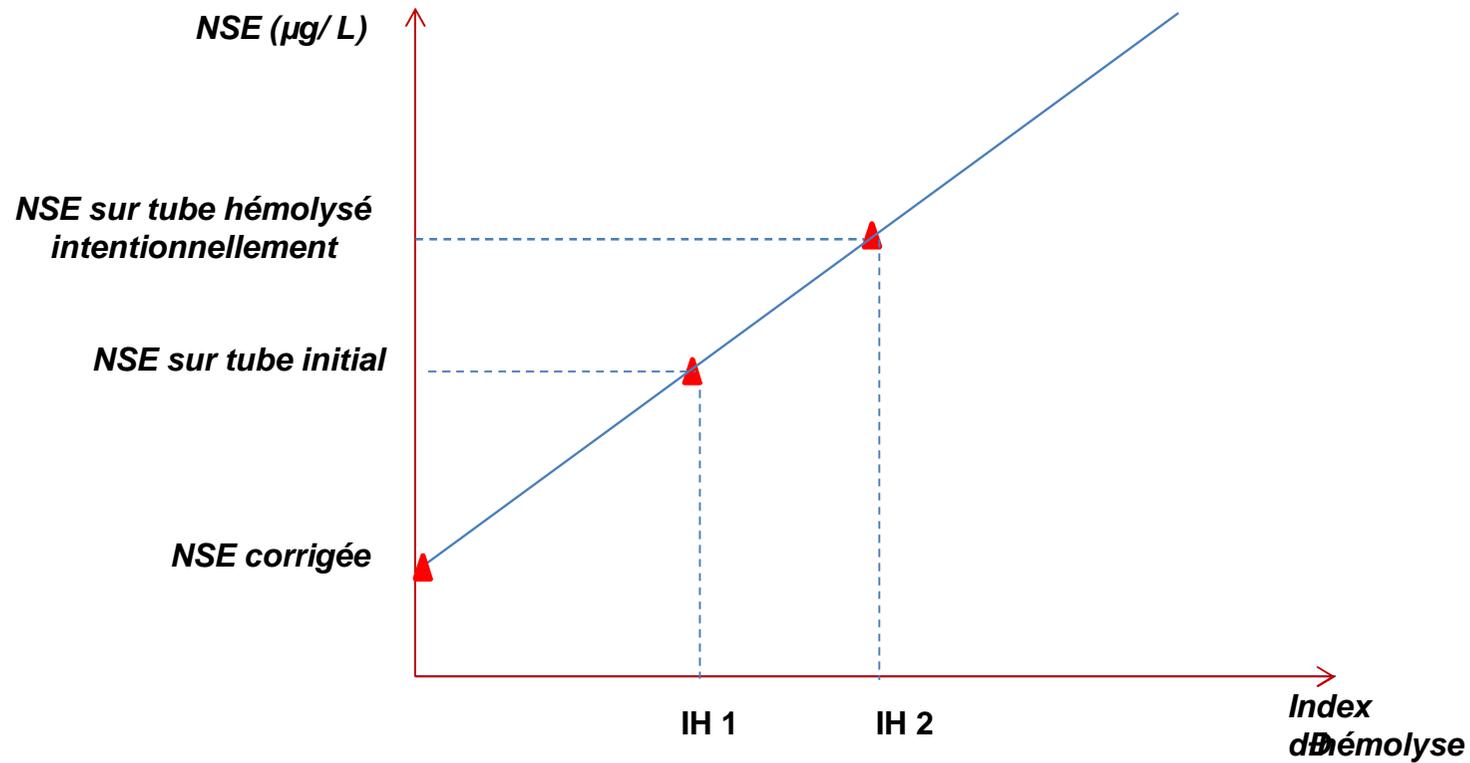
3. Application pratique de la nouvelle méthode de correction

□ Algorithme adopté:



3. Application pratique de la nouvelle méthode de correction

☐ Méthode de correction



3. Application pratique de la nouvelle méthode de correction

□ Premiers résultats:

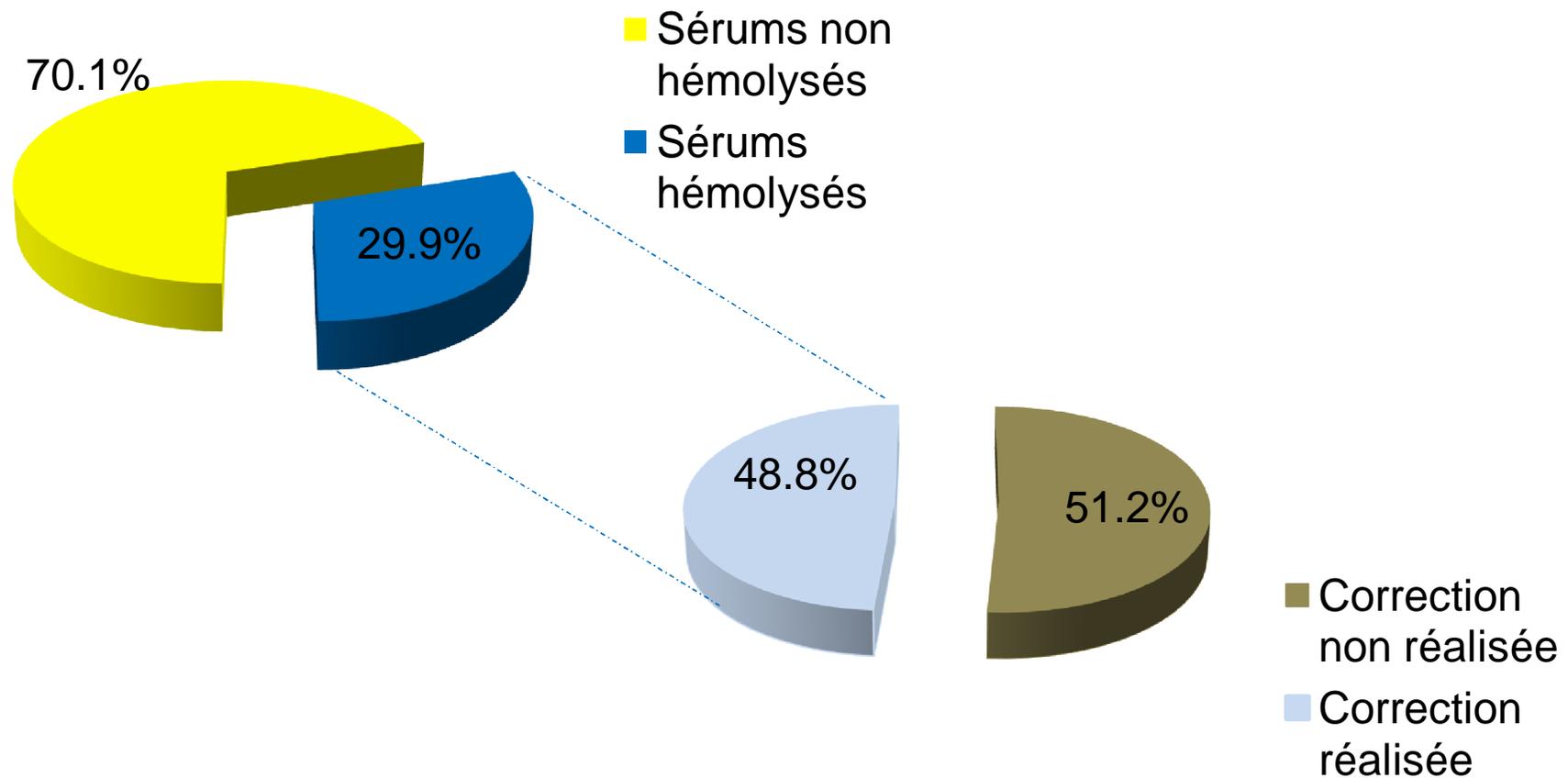


Figure 6: Distribution des demandes d'analyse de NSE

PLAN

I. INTRODUCTION

II. INTÉRÊTS DE DOSAGE

III. MÉTHODES DE DOSAGE

IV. IMPACT DE L'HEMOLYSE

V. METHODE DE CORRECTION

VI. CONCLUSION

VI. CONCLUSION

- ✓ La NSE est un marqueur des tumeurs d'origine neuroectodermique et neuroendocrinienne
- ✓ Sa concentration à 48-72 heures après AC est un élément solide de pronostic, mais les seuils sont variables selon les études
- ✓ L'exactitude des concentrations de NSE est cruciale notamment pour le pronostic et le suivi des patients
- ✓ Toutefois, une hémolyse même invisible à l'œil, influe sur son dosage
- ✓ Le développement d'une méthode de correction des taux de NSE sur sérum hémolysé est donc d'une grande importance et permettra une meilleure prise en charge des patients.

MERCI POUR VOTRE ATTENTION