

Du nouveau dans l'exploration du système du Complément au CHU de Lille : Dosages des fractions C5b-9 et Bb.

Sylvain DUBUCQUOI, Stéphanie ROGEAU, Benjamin LOPEZ, Anne Sophie DELEPLANCQUE,
Mathieu TRONCHON.

Institut d'immunologie, CHU de LILLE

Le texte proposé ci-dessous présente deux niveaux de lecture.

- Un lecteur « novice » dans le domaine du Complément pourra trouver intérêt à lire son intégralité.
- Un lecteur qui se sent plus expert, pourra se contenter des paragraphes grisés.

Le système du complément et ses fonctions : un bref rappel

Le système du Complément est un des plus anciens systèmes de défense mis en place dans le monde animal. Particulièrement efficace dans la protection d'un organisme, il a été préservé au fil de l'évolution des Espèces, bénéficiant même de mécanismes d'adaptation qui diversifient les conditions de son activation. Chez certaines espèces animales (comme la nôtre), il est possible de décrire différentes voies d'activation : voies « classique », « alterne » et plus récemment décrite, la « voie des lectines » (figure 1 A). Pour d'autres espèces, les poissons de mer par exemple, seule la voie alterne a pu évoluer, permettant son activation à basse température.

Le système du Complément est composé de 30 à 50 molécules solubles ou membranaires.

Certaines protéines circulent à l'état inactif, et au cours de l'activation du complément, subissent des modifications par clivage enzymatique, conduisant en cascade, à la génération de différents mécanismes de défense : la lyse, la phagocytose, l'amplification de l'inflammation en général (figure 1B).

D'autres molécules assurent un contrôle précis des processus d'activation, permettant *in fine*, de protéger les cellules de l'hôte en évitant qu'elles ne soient elles-mêmes agressées lors de l'activation du complément.

On obtient ainsi une défense élaborée, qui cible spécifiquement l'agresseur, interagissant avec les autres mécanismes de défense immunitaire (dépendants des polynucléaires neutrophiles, macrophages, lymphocytes...) mis en place au cours de la réponse inflammatoire. Tout en épargnant l'hôte des conséquences de l'activation du Complément. (On découvre encore aujourd'hui d'autres fonctions associées à l'activation du complément (figure 1B)).

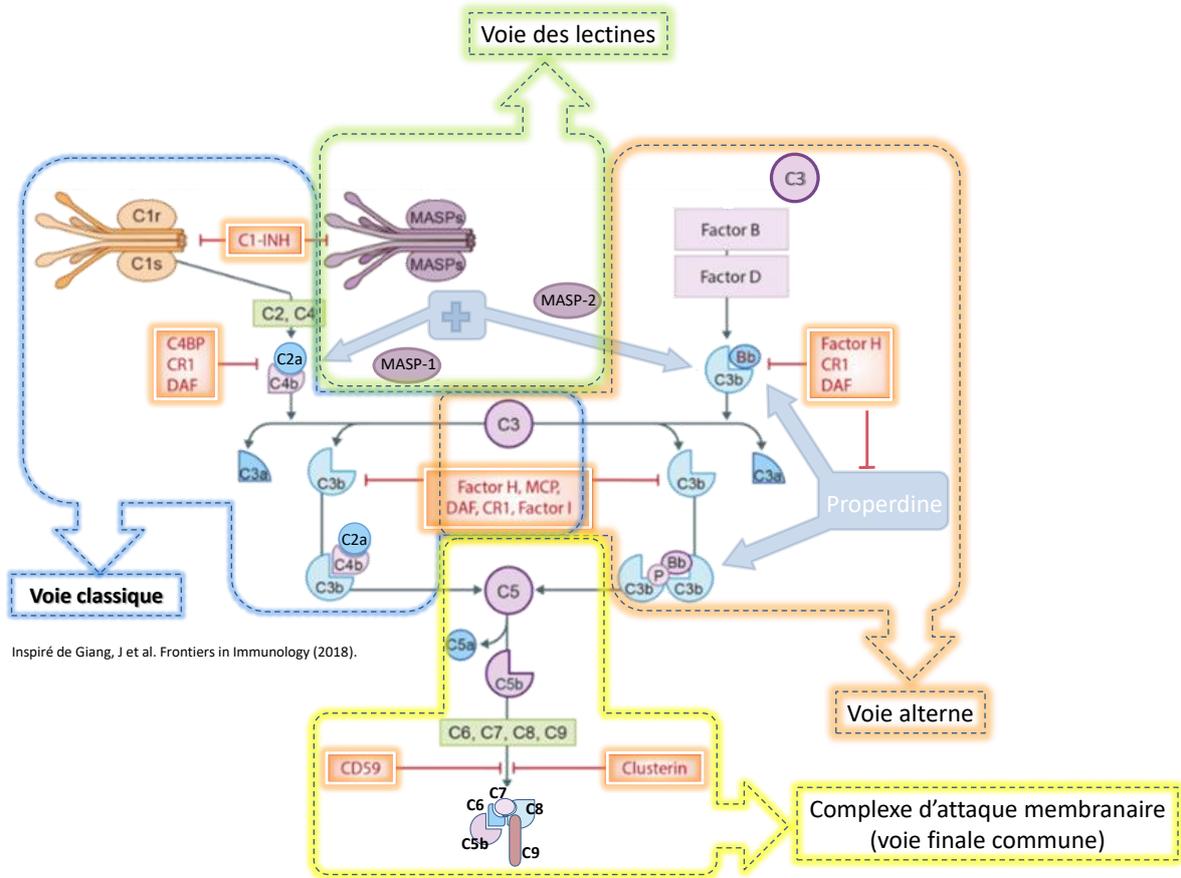
Pour assurer une défense optimale, l'activation du complément, particulièrement pour la voie alterne peut être spontanée.

- Si cet organisme est l'objet d'une agression par un agent pathogène, l'activation de cette voie sera alors amplifiée par la seule présence de l'agresseur qui ne dispose pas des moyens de se protéger contre l'activation du complément.
- En l'absence d'agent pathogène, les systèmes de contrôle, lorsqu'ils sont présents et fonctionnels, permettent de limiter dans le temps et dans l'espace cette activation spontanée, qui reste alors sans conséquence pour l'organisme.

On précisera encore, que si le système du complément est sollicité en cas d'agression par un agent pathogène, il intervient aussi pour éliminer les cellules qui ont été agressées (ischémie, dégénérescence...). Celles-ci ne sont en effet plus capables de se protéger contre l'activation du Complément. Ce mécanisme est utile pour éliminer des cellules en souffrance, cellules dont l'accumulation pourrait devenir toxique pour l'organisme (figure 1B). Toutefois, si l'activation du complément n'est elle-même, plus contrôlée, elle peut devenir délétère pour certains organes : les reins, par exemple, y sont particulièrement sensibles.

Ce qu'il faut retenir est que **différentes pathologies peuvent se développer si les mécanismes de contrôles du Complément sont défailants.**

A



B

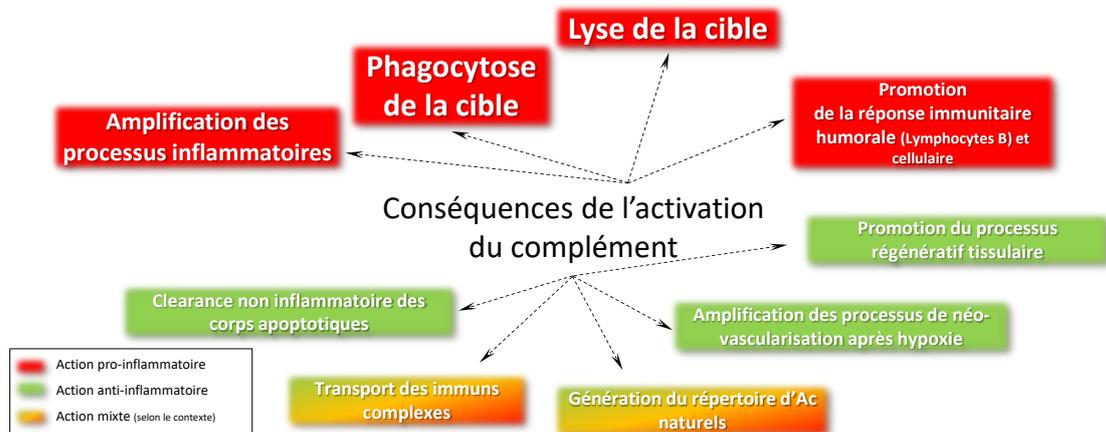


Figure 1 :

(A) Différentes voies d'activation et facteurs impliqués. Les molécules impliquées dans le contrôle de l'activation sont précisées dans les cadres orangés.

(B) Les fonctions du complément. Certaines fonctions structurent la défense de l'organisme au travers de mécanismes qui contribuent à l'inflammation, d'autres, à l'inverse, visent à limiter l'inflammation et facilitent même la trophicité tissulaire.

Exploration du système du complément : indications et méthodes

Si le système du complément est un système **complexe** (plus de 30 composés, nomenclature « élaborée », différentes voies d'activation, anomalies du complément relativement rares...), son **exploration l'est tout autant** et généralement réservée aux laboratoires spécialisés.

L'exploration du système du complément peut être proposée en cas (voir tableau I) :

- De suspicion de **déficit en protéines du complément**.
Ils se révèlent de différentes manières : (i) Sensibilité accrue aux infections, mais aussi (ii) manifestations pathologiques liées à un défaut de contrôle de l'activation du complément. C'est le cas, par exemple, de l'angioedème à bradykinine (par déficit de l'inhibiteur de la C1 estérase) ou au cours de syndromes hémolytiques et urémiques, dits « *atypiques* », notamment, par défaut de régulation de la voie alterne.
- De pathologies comme le **lupus** ou liées à la présence de **cryoglobulines** qui s'accompagnent d'une **consommation des protéines du complément**, par activation de la voie classique du complément.

Évaluer la consommation des protéines du complément et définir quelle(s) voie(s) d'activation est (ou sont) concernée(s) est donc utile à la démarche diagnostique et de suivi de ces pathologies.

- Infections

- Précoces, sévères, à pyogènes : déficit en composé C3 (exceptionnel +++)
- Méningées, touchant autant les filles que les garçons : **déficit en composés C5, C6, C7, C8, C9**
- Méningées, touchant les **garçons** : déficit en **properdine**.

- Manifestations systémiques

- **Syndromes hémolytiques et urémiques atypiques** (c'est-à-dire non liés à une toxi-infection alimentaire à *E. coli* O157:H7 avec production de vérotoxine) / Micro-angiopathies thrombotiques : **déficits en facteur H, I** ou MCP (CD46), associées à une activation de la voie alterne.
- Syndrome de *Barraquer Simons* (lipodystrophie) et glomérulonéphrites membranoprolifératives de type III : recherche d'un « C3 nephritic factor » (**C3Nef**), avec activation de la voie alterne.
- **Lupus** érythémateux systémique et **cryoglobuline** : **diminution** du CH50 et (principalement) du facteur C4 par activation de la voie classique (le taux de C3 reste généralement dans les valeurs normales, sauf en cas d'activation majeure).
- **Angioedème à bradykinine** (déficit, quantitatif et/ou fonctionnel, en inhibiteur de la C1 estérase) conduisant à l'activation de la voie classique du complément.
Se rappeler qu'un angioedème peut se révéler après 40 ans, on parle alors d'**angioedème acquis**. Il peut révéler des pathologies comme une dysglobulinémie monoclonale, une néoplasie, une maladie auto-immune. Il peut aussi être associé à certaines prises médicamenteuses (IEC, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine, certains anti-diabétiques oraux). Les mécanismes ne sont alors pas toujours liés à un déficit de l'inhibiteur de la C1 estérase et justifient d'explorations spécifiques.

De manière générale, **les déficits constitutifs en protéines du complément sont rares** hormis pour le facteur C2 (mais il est fréquemment asymptomatique).

Tableau I : principales indications de l'exploration du complément

Méthodes

L'exploration « de première intention » du système du complément comprend, au minimum, un test fonctionnel (CH50 ou « complément total ») et des **dosages quantitatifs** des protéines C3c et C4 réalisés par le même laboratoire. C'est l'interprétation combinée des résultats des différents dosages qui permet d'éclairer les mécanismes qui ont conduit à l'activation du complément, si elle existe.

Selon le contexte clinico-biologique, cette exploration sera complétée par (i) les dosages quantitatifs/fonctionnels de l'inhibiteur de la C1 estérase, (ii) de dosages quantitatifs/fonctionnels des différents facteurs du complément ou des protéines de contrôle (Facteurs H, I, CD46...), ou (iii) d'autres encore, plus spécifiques à la voie alterne.

Il est important de rappeler que le système du complément est sensible **aux processus d'activation in vitro**, de sorte que les laboratoires référents travaillent sur prélèvements EDTA (Lille, Paris) ou citrate (Grenoble), en **excluant les prélèvements sur tubes secs** qui sont plus sensibles à cette activation *in vitro*. Les prélèvements sur tube sec sont à proscrire.

De même, les délais d'acheminement et de traitement des prélèvements à l'arrivée au laboratoire, sont cruciaux pour limiter cette activation *in vitro*, même sur prélèvements avec anticoagulants. La température idéale de conservation des prélèvements est -80°C.

Quels tests ?

Les tests fonctionnels :

- **Le CH50** (Complément hémolytique 50%) et le « Complément total » explorent les propriétés fonctionnelles (activation en cascade) des composés spécifiques **de la voie classique** (C1_{QRS}, C4 et C2), du C3 et des fractions de la voie finale commune (C5-C9). Il existe différentes méthodes de dosage. Aucune n'est standardisée et les résultats rendus par les différentes techniques ou automate ne sont pas corrélés.
- L'**AP50** (« *Alternative Pathway 50%* ») explore les propriétés fonctionnelles des composés C3, B, D properdine, spécifiques de la **voie alterne** et ceux de la voie finale commune (de C5 à C9).

Les dosages quantitatifs :

- Les dosages spécifiques de telle ou telle fraction du complément (C3, C4, inhibiteur de la C1 estérase, facteur B...) font appel à des méthodes de néphélométrie, turbidimétrie ou encore ELISA. Là encore, les résultats (et les valeurs normales) peuvent dépendre des méthodes et des automates utilisés. La corrélation des résultats est généralement meilleure mais pas absolue entre les méthodes et automates.

Un élément supplémentaire rend l'interprétation des résultats des explorations du complément délicate : **les bornes de valeurs normales dans la population générale sont larges**. Notre équipe a récemment publié des bornes de valeurs normales pour nos méthodes d'exploration du Complément (Lopez B, et al. Classical pathway activity C3c, C4 and C1-inhibitor protein reference intervals determination in EDTA plasma ; Biochem Med. 2019;29(3):030707.doi:10.11613/BM.2019.030707).

Pour illustrer cette notion, un exemple :

Les valeurs normales (95% de la population générale) de notre méthode de dosage du CH50 s'étendent de ~32 à 72 U/mL ; celles du C3 de 810 à près de 1600 mg/L.

- Un individu qui aura des valeurs de CH50 à 35U/mL, de C3 à 900 mg/l et un autre, 65U/mL (CH50) et 1300 mg/l (C3), pourront tous deux ne pas présenter d'anomalies du système du complément. Ces valeurs seront donc « physiologiques » pour eux.
- Mais, un même individu dont les valeurs, lors de deux dosages successifs, passeraient de 65 à 35U/mL (CH50) et de 1300 à 900 mg/L (C3) présenterait probablement une activation du complément qu'il faudrait documenter...
-

Plus encore, certaines diminutions des fractions du complément sont liées à un *défaut de production* (principalement hépatique) et non à une consommation *par activation*.

On comprend qu'il peut être difficile de faire la part des choses : « normal » ?, « défaut de production ? » ou « consommation ? » par la seule comparaison des résultats obtenus à un moment donné, pour un patient, et par rapport à des bornes établies dans la population générale.

La répétition des examens, dans un contexte clinique le justifiant, une bonne connaissance des mécanismes d'activation du complément ainsi que les dosages de composés spécifiquement produits durant l'activation du complément peuvent toutefois aider à l'interprétation (figure 2).

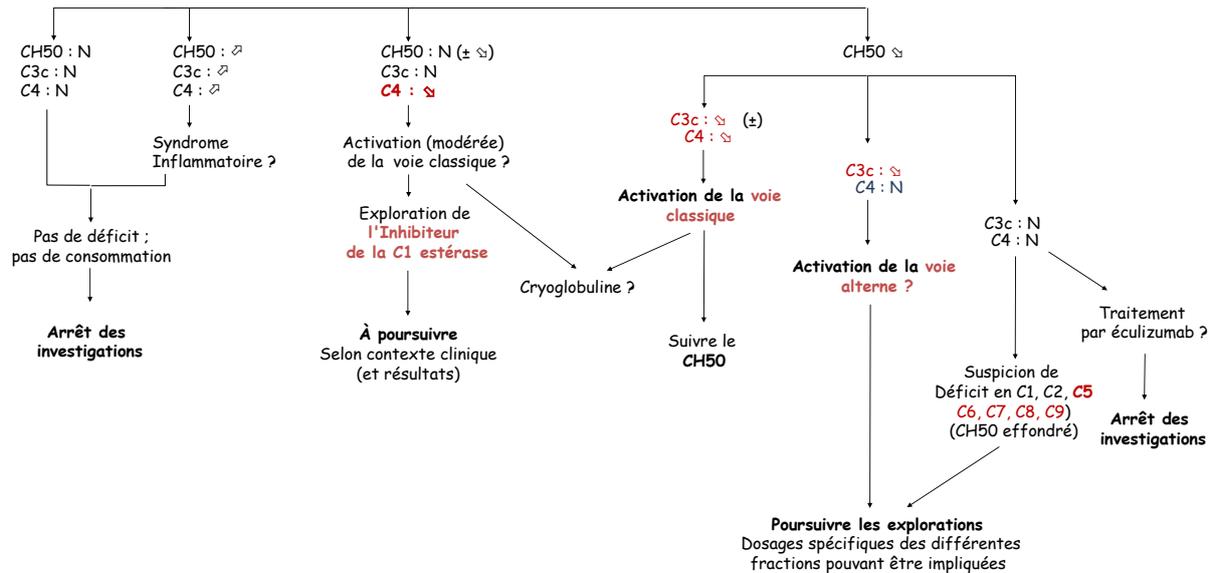


Figure 2 : Logigramme d'interprétation des résultats des principaux dosages associés à l'exploration du complément : CH50, C3 (C3c) et C4.

Quoi de neuf au CHU de Lille en 2021.

Cette année, le Centre de Biologie Pathologie du CHU de Lille, et particulièrement l'Institut d'Immunologie dans ce domaine, a été reconnu par l'ARS, « *Laboratoire de référence pour les pathologies associées au système du Complément* ». Cette reconnaissance est en lien avec la labellisation « *Centre de référence pour la prise en charge de l'angioedème à Bradykinine par déficit de l'inhibiteur de la C1 estérase*, « CREAK », associé au Service de Médecine Interne et coordonné par le Professeur David LAUNAY.

Au-delà de la prise en charge biologique de l'angioedème, la labellisation de notre laboratoire est aussi en lien avec notre démarche pour **proposer les examens biologiques les plus appropriés et une interprétation personnalisée pour chaque demande d'exploration du Complément qui nous est adressée.**

C'est dans cette optique que nous avons récemment mis en place deux nouveaux dosages au sein de notre laboratoire : **les dosages des fractions « C5b-9 » et « Bb » par méthode ELISA.**

- La **fraction C5b-9** est produite lorsque l'activation du complément conduit à la génération du complexe d'attaque membranaire (figure 1). Son augmentation traduit donc une activation « *totale* » du complément quelle que soit la voie concernée. Un traitement efficace par éculizumab bloquera donc la production de cette fraction.

Pour les bilans pour lesquels l'interprétation « *hésite* » entre « *normal* », « *défaut de production* » ou « *activation* », ce dosage permet d'orienter ou non, en faveur d'une activation.

Nous avons par ailleurs observé que les cinétiques de production mais aussi d'élimination de la fraction C5b-9 sont rapides. Cela signifie (i) qu'une élévation de cette fraction peut précéder l'altération des marqueurs plus conventionnels tels que le CH50, C3, C4 (qui peuvent rester alors dans les valeurs physiologiques d'une population générale). (ii) *A contrario*, le dosage peut montrer des valeurs physiologiques de C5b9 (il n'a plus d'activation au moment du prélèvement) alors que les dosages des CH50 C3 et C4 sont encore altérés, par retard de reconstitution des réserves.

- La **fraction Bb** (lire « *Grand B petit B* ») correspond, elle, à la fraction activée du « *Facteur B* », acteur important de l'initiation de l'activation de la voie alterne. Une augmentation des taux circulants de la fraction Bb traduit donc une activation de cette voie. Son dosage vient donc utilement compléter les bilans pour lesquels les taux de C3 sont subnormaux ou abaissés, laissant suspecter une activation de la voie alterne, activation pour laquelle le seul dosage du CH50 n'est pas approprié.

Les dosages des fractions « *C5b-9* » et « *Bb* » sont réalisés **sur demandes des services prescripteurs**, mais peuvent aussi être proposés par les biologistes de notre laboratoire, afin d'éclairer l'interprétation d'un bilan.

Ils ne sont pas ajoutés pour les bilans pour lesquels les dosages des **CH50, C3 et C4 n'auraient pas été réalisés** dans notre laboratoire, dossiers pour lesquels nous ne fournissons aucune interprétation des dosages.

PRÉLÈVEMENTS

Tube EDTA 1 tube de 5 mL :

transmettre 2 aliquots de plasma de 500 µL réfrigéré (le délai d'acheminement ne doit pas excéder 3jours) ou congelé.

Lien catalogue des analyses :

<https://biologiepathologie.chu-lille.fr/catalogue-analyses/Detail.php?codeCatalogueAnalyses=5044>

NOMENCLATURE – REMBOURSEMENT

- CH50 : B30 -316

- C3c : B25-1811

- C4 : B25-1812

- Inhibiteur de la C1 estérase : B35-1810

- Fractions C5b-9 et Bb : RIHN K197 (BHN 70 à l'unité : 18,9 €)

CONTACTS

Dr Stéphanie ROGEAU : stephanie.ROGEAU@chu-lille.fr

Dr Mathieu TRONCHON : mathieu.tronchon@chu-lille.fr

Site internet : biologiepathologie.chu-lille.fr