



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2024

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Valeurs de référence et stabilité des paramètres du complément
sC5b-9 et facteur Bb sur plasma EDTA**

Présentée et soutenue publiquement le 16/10/2024 à 16h
au Pôle Formation
par **Amine ASSEM**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Sylvain DUBUCQUOI

Assesseurs :

Madame le Professeur Marie FRIMAT

Monsieur le Docteur Benjamin LOPEZ

Directeurs de thèse :

Monsieur le Docteur Mathieu TRONCHON

Madame le Docteur Aurore COLLET

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Résumé

Contexte : Les dosages du sC5b-9 et de la fraction Bb du complément sont d'une aide précieuse pour le diagnostic et le suivi du traitement de nombreuses pathologies impliquant le complément. Face à la difficulté d'interprétation des anomalies du complément, il est important de disposer d'intervalles de référence fiables, et d'effectuer ces dosages dans des conditions pré-analytiques adaptées. Les objectifs de notre travail sont de déterminer des intervalles de référence du sC5b-9 et de la fraction Bb propres à notre laboratoire, et d'étudier la stabilité de ces paramètres dans différentes conditions pré-analytiques.

Méthode : Cette étude monocentrique rétrospective s'est portée sur des prélèvements reçus au CHU de Lille issus de patients ne présentant pas de pathologie modifiant les concentrations des protéines du complément, et dont les paramètres du complément de 1^{ère} intention (C3, C4, CH50) étaient normaux. Les intervalles de référence ont été calculés selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute. Concernant l'étude de stabilité, nous avons étudié l'impact des cycles de congélation/décongélation, et de la conservation à 4°C et à température ambiante, ainsi que les variations quotidiennes chez un même individu sain.

Résultats : Entre septembre 2023 et février 2024, 4813 bilans contenant au moins un paramètre de 1^{ère} intention ont été réalisés. Deux-cent dix prélèvements ont été inclus. L'intervalle de référence pour le sC5b-9 au sein de notre laboratoire était de 85 [75-91] à 432 [383-472] ng/ml, celui du facteur Bb était de 0,63 [0,58-0,67] à 1,71 [1,58-1,85] µg/ml. La stabilité du dosage de sC5b-9 sur plasma EDTA n'était garantie qu'après un seul cycle de congélation/décongélation, seulement 24 heures à température ambiante et 48h si conservé à 4°C. La stabilité du facteur Bb était meilleure que celle du sC5b-9 dans toutes les conditions testées.

Conclusion : Les bornes de l'intervalles de référence du sC5b-9 déterminés par notre étude sont plus élevées que celles du fournisseur, alors que celles du facteur Bb sont sensiblement similaires. De plus, cette étude souligne l'instabilité du sC5b-9 en fonction des conditions pré-analytiques.

Table des matières

Liste des abréviations	6
Table des tableaux et des illustrations	8
I- Introduction	10
1- Présentation et rôles du complément	10
2- Voies d'activation du complément	11
a- La voie classique	11
b- La voie des lectines	12
c- La voie alterne	12
d- La voie finale commune	14
3- Fonction du complément	15
a- L'opsonisation	15
b- La libération d'anaphylatoxines	15
c- L'activation du CAM	15
4- Régulation de la cascade d'activation du complément	16
5- Complément et pathologies	17
a- Infections	18
b- Lupus érythémateux disséminé	18
c- Hémoglobinurie paroxystique nocturne	19
d- Syndrome hémolytique et urémique	19
e- Autres pathologies	20
6- Traitements visant le complément	21
7- Explorations biologiques du système du complément	22
a- Bilan de première intention	22
b- Bilan de seconde intention	25
c- Indications et interprétation des bilans de seconde intention	26
8- Problématiques	27
9- Objectifs	29
II- Matériel et méthodes	30
1-Méthodes de dosage des paramètres sC5b-9 et facteur Bb	30
2- Établissement des intervalles de référence	32
a- Phase pré-analytique et conservation	32
b- Sélection des patients	33
c- Méthodologie statistique	35
3- Étude de la stabilité	36
a- Cycles de congélation/décongélation	37
b- Stabilité à 4°C et à température ambiante	38
c- Variations quotidiennes	39
d- Analyse des résultats	39
III- Résultats	41
1- Intervalle de référence	41
a- Patients inclus	41
b- Description des patients inclus	42

c- sC5b-9	43
d- Facteur Bb	47
e- Incidence de l'âge	49
2- Étude de stabilité	50
a- Cycles de congélation/décongélation	51
b- Stabilité à température ambiante	52
c- Stabilité à 4°C	53
d- Variations quotidiennes	54
IV- Discussion	57
1- Echantillons et patients analysés	57
2- Intervalles de référence	59
a- sC5b-9	59
b- Facteur Bb	62
3- Tests de stabilité	63
V- Conclusion	66
Références	67
Annexes	73

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ACL	Acceptable Change Limit
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
C1-INH	Inhibiteur de C1
CAM	Complexe d'Attaque Membranaire
CLSI	Clinical and Laboratories Standards Institute
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
CV	Coefficient de Variation
DAF	Decay Accelerating Factor
DNP	Dinitrophényl
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EFS	Établissement français du sang
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G6PD	Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol
HPN	Hémoglobininurie Paroxystique Nocturne
IC90	Intervalle de confiance à 90%
LED	Lupus Erythémateux Disséminé
MBL	Mannose Binding Lectin
MCP	Membrane Cofactor Protein

NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
RIPK	Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase

Table des tableaux et des illustrations

1- Tableaux

Tableau 1 : Principales protéines régulatrices de la cascade du complément	17
Tableau 2 : Valeurs de référence C3-C4-CH50	23
Tableau 3 : Intervalles de référence sur plasma EDTA du sC5b-9 et du facteur Bb établis par le fournisseur	28
Tableau 4 : Critères d'exclusion	34
Tableau 5 : Coefficient de variation (CV) de fidélité intermédiaire maximal et bornes d' <i>acceptable change limit</i> (ACL) pour chacun des paramètres.	40
Tableau 6 : Description de la population	43
Tableau 7 : Nouveaux intervalles de référence pour le sC5b-9	45
Tableau 8 : Analyse des <i>outliers</i> - sC5b-9	46
Tableau 9 : Patients présentant les 10 valeurs les plus élevées du sC5b-9	46
Tableau 10 : Intervalles de référence pour le facteur Bb	48

2- Figures

Figure 1 : Mécanismes d'action du complément	10
Figure 2 : Voies d'activation et de régulation du complément	11
Figure 3 : Formation de la C3 et de la C5 convertase	13
Figure 4 : Voie finale commune d'activation du complément	14
Figure 5 : Complexe d'attaque membranaire	15
Figure 6 : Conséquences cellulaires de l'activation du CAM (ions-dépendant)	16

Figure 7 : Inhibiteurs du complément	21
Figure 8 : Principe de la méthode liposomale	24
Figure 9 : Principe de la méthode ELISA	31
Figure 10 : Dosages réalisés pour l'étude de la stabilité – Cycle congélation/décongélation	37
Figure 11 : Dosages réalisés pour l'étude de la stabilité à 4°C et à température ambiante	38
Figure 12 : Flow chart de l'étude	42
Figure 13 : Distribution des valeurs du sC5b-9 avant transformation	44
Figure 14 : Présentation de l'intervalle de référence du sC5b-9	45
Figure 15 : Distribution des valeurs du facteur Bb avant transformation	48
Figure 16 : Présentation de l'intervalle de référence du facteur Bb	49
Figure 17 : Valeurs du sC5b-9 (A) et du facteur Bb (B) en fonction de l'âge	50
Figure 18 : tests de stabilité pour le sC5b-9	55
Figure 19 : tests de stabilité pour le facteur Bb	56
Figure 20: Dosages à réaliser pour l'étude de la stabilité - Congélation à moyen et long terme	65

I- Introduction

1- Présentation et rôles du complément :

Le système du complément a été découvert à la fin du 19^{ème} siècle, comme une substance thermolabile qui « complétait » l'action des anticorps (1). Il est composé de plus de 50 protéines plasmatiques et membranaires appartenant à l'immunité innée mais jouant aussi un rôle dans la régulation de l'immunité adaptative (2).

Ainsi, il joue un rôle primordial dans l'inflammation et la défense contre les agents pathogènes grâce à trois mécanismes principaux (3) (figure 1) :

- L'opsonisation,
- La libération d'anaphylatoxines,
- La formation du complexe d'attaque membranaire (CAM).

Ces mécanismes seront détaillés dans le paragraphe I-3.

Par ailleurs, le système du complément soutient également divers processus en dehors de l'immunité tels que la régénération tissulaire ou l'hématopoïèse (4).

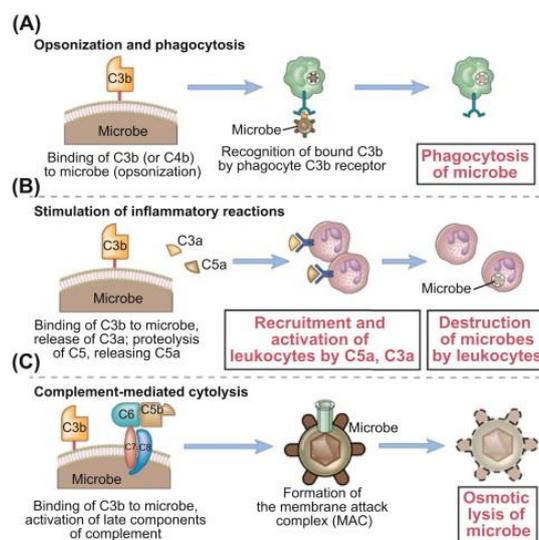


Figure 1 : Mécanismes d'action du complément (5)

2- Voies d'activation du complément :

Les protéines du complément s'activent par une cascade enzymatique.

Les protéines de la cascade sont désignées par des lettres majuscules (par exemple B et C), éventuellement suivies d'un numéro. La lettre minuscule "a" ou "b" (par exemple C2a ou Bb) indique les fragments issus d'une protéolyse.

Trois voies d'activation du complément existent (figure 2) (6) :

- La voie classique,
- La voie des lectines,
- Et la voie alterne.

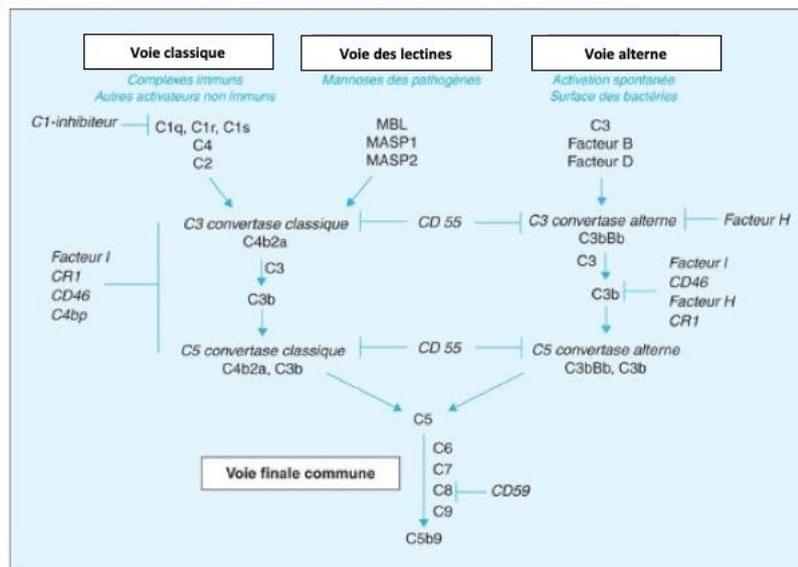


Figure 2 : Voies d'activation et de régulation du complément (6)

a- La voie classique

La voie classique est initiée par la fraction C1q qui reconnaît certaines molécules cibles (complexes immuns, ligands endogènes comme les pentraxines ou d'autres protéines à la surface de certaines cellules apoptotiques et bactéries). Un changement de

conformation se produit, permettant au C1q d'interagir avec C1r et C1s et d'activer l'ensemble du complexe C1.

Le C1 activé clive C2 en C2a et C2b ; et C4 en C4a et C4b. C4b et C2a se lient et génèrent C4b2a ; appelée la C3 convertase de la voie classique. Cette dernière clive le C3 en C3a et C3b.

L'association de C3b avec la C3 convertase forme le complexe trimoléculaire C4b2a3b appelé C5 convertase. Ce dernier clive C5 en C5a et C5b (Figure 3).

b- La voie des lectines

La voie des lectines joue un rôle crucial dans la défense contre les infections, indépendamment des anticorps. Elle se déclenche lorsque des protéines de liaison aux mannoses (MBL ou Mannose Binding Lectin) ou des ficolines reconnaissent des motifs de glucides sur les pathogènes. Cette liaison recrute et active les sérine protéases associées à MBL, MASP-1 et MASP-2, qui clivent les protéines du complément C2 et C4, formant le complexe C3 convertase (C4b2a). Ce complexe est le même que celui de la voie classique et aboutit au clivage du C3 puis à la formation de la C5 convertase (Figure 3).

c- La voie alterne

A la différence des 2 voies précédemment décrites, la voie alterne est activée de manière permanente et spontanée, sans besoin de reconnaissance spécifique des pathogènes, par l'hydrolyse de C3 en C3(H₂O) ; forme bioactive du C3. Ce processus appelé *tick over* (7) permet une réactivité plus rapide face aux agents pathogènes.

Le C3(H₂O) se fixe au facteur B, permettant son clivage par le facteur D. Le complexe C3(H₂O)Bb constitue une C3 convertase soluble capable de cliver le C3 en C3a et C3b.

A la surface des pathogènes, le C3b (généralisé par ce *tick over*, mais pouvant aussi provenir du clivage de C3 par la C3 convertase classique) se lie au facteur B, qui est clivé par le facteur D pour former la C3 convertase alterne (C3bBb). Celle-ci clive davantage de C3 en C3a et C3b, générant une boucle d'amplification. La properdine (facteur P) stabilise la C3 convertase alterne, prolongeant ainsi sa demi-vie et augmentant son efficacité. L'association de C3b supplémentaire avec la C3 convertase alterne forme la C5 convertase alterne (C3bBbC3b), qui clive C5 en C5a et C5b (Figure 3).

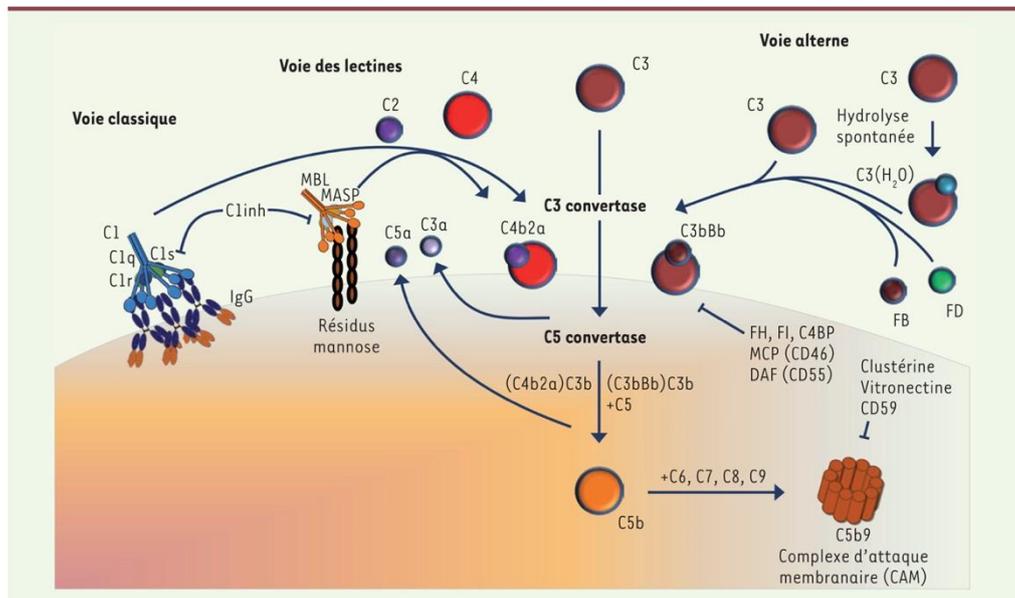


Figure 3 : Formation de la C3 et de la C5 convertase (8)

d- La voie finale commune

Les 3 voies d'activation ont comme point commun la formation d'une C5 convertase (classique ou alterne) (figure 4) (9). Cette dernière entraîne une protéolyse du C5 en C5a et C5b. Ce dernier se lie à C6 puis à C7. Le complexe C5b-7 est lipophile et peut s'ancrer à la membrane cellulaire. Il va à son tour se lier à C8 (C5b-8) puis à C9, aboutissant à la formation du CAM (C5b-9 membranaire), aux propriétés lytiques.

La liaison du CAM à la membrane cellulaire peut être inhibée par la vitronectine et par la clustérine (10). Ces dernières bloquent la fixation du C5b-7 à la membrane cellulaire (11). Le C5b-7 va alors lier C8 puis C9 et produire un complexe C5b-9 soluble (sC5b-9), sans activité lytique, mais avec un rôle dans le développement de l'inflammation.

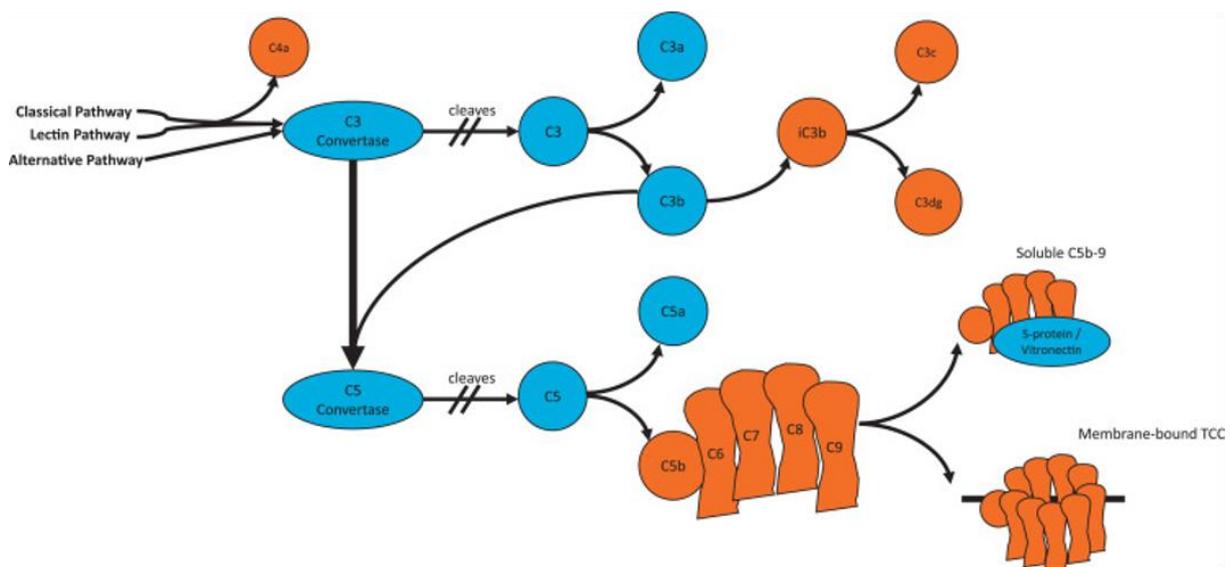


Figure 4 : Voie finale commune d'activation du complément, adapté de Wijaya et. al. (9)

3- Fonctions du complément

a- L'opsonisation

Le C3b est une opsonine, c'est-à-dire une molécule qui se fixe à la surface de la cellule cible, permettant sa phagocytose par liaison aux récepteurs de type 1 du complément (CR1) présent sur les cellules phagocytaires.

b- La libération d'anaphylatoxines

Les protéines C3a, C4a et C5a sont des anaphylatoxines. Elles stimulent notamment la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) par les macrophages et de médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine, activent les cellules endothéliales en augmentant l'expression membranaire des molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1) et favorisent par chimiotactisme l'attraction des cellules inflammatoires vers le site de phagocytose, entraînant ainsi une réaction inflammatoire (12).

c- L'activation du CAM

Le CAM entraîne la lyse cellulaire en formant des pores transmembranaires dans la cellule cible (figure 5) (13), désorganisant la bicouche lipidique membranaire.

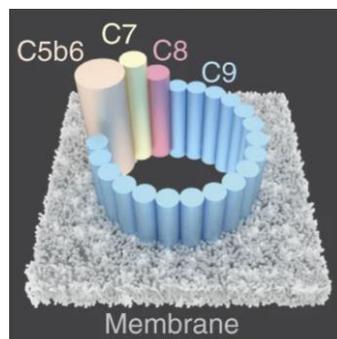


Figure 5 : Complexe d'attaque membranaire (13)

L'activation du CAM permet une entrée passive d'eau et des mouvements ioniques (14) ; entrainant ainsi un déséquilibre osmotique provoquant la mort cellulaire par osmolyse. Par ailleurs, l'afflux de calcium dans la cellule cible active des facteurs lytiques comme calpain et RIPK-1 et 3 (Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase) (Figure 6).

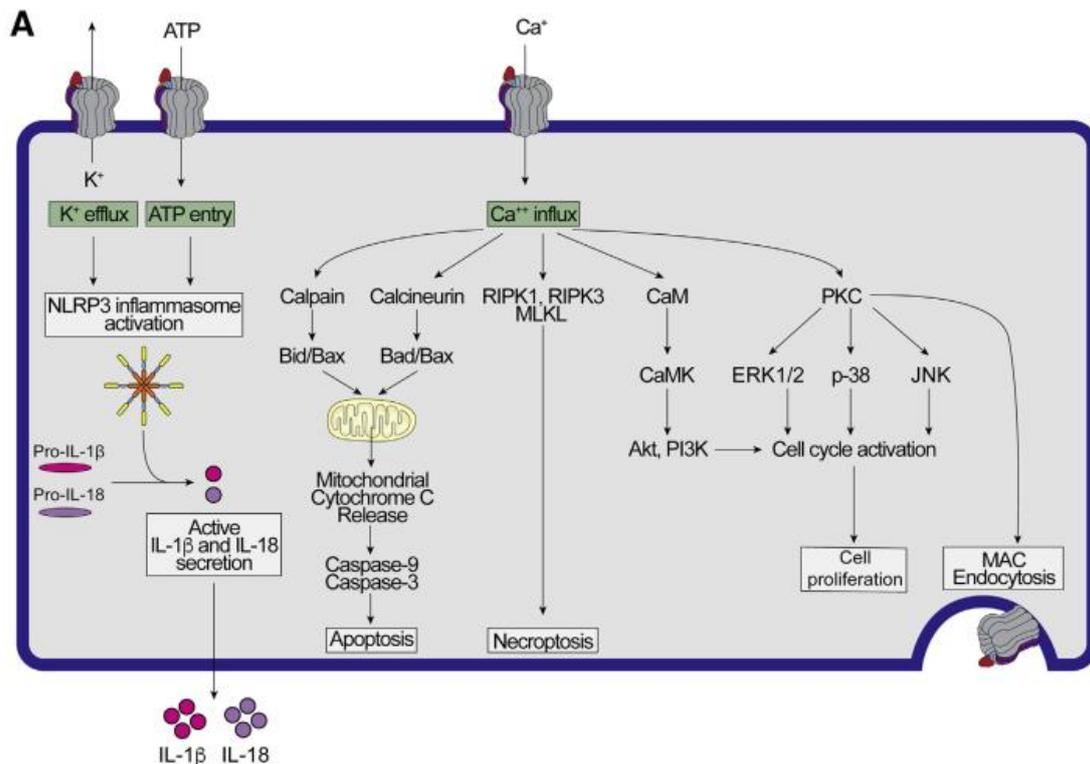


Figure 6 : Conséquences cellulaires de l'activation du CAM (ions-dépendants) (14)

4- Régulation de la cascade d'activation du complément

Afin de protéger les tissus sains contre une activation excessive du complément, la régulation de la cascade d'activation se fait à plusieurs niveaux, par des régulateurs tissulaires et en phase liquide. Le tableau 1 résume les principales protéines régulatrices.

Par exemple, l'inhibiteur de C1 (C1-INH) inhibe l'activation de la voie classique du complément et le facteur H régule l'activation de la voie alterne.

Regulator	Function	Location
C1 inhibitor (C1-INH)	Inactivates C1r and C1s, MASP-1, and MASP-2	Plasma
MCP	Cofactor for factor I-mediated cleavage of C3b and C4b	Membrane-bound
DAF	Destabilizes C3/C5 convertases of the CP and AP (decay accelerating activity)	Membrane-bound
CR1	Decay accelerating activity as well as cofactor activity for factor I-mediated cleavage of C3b and C4b	Membrane-bound
C4 binding protein (C4BP)	Binds to C4b; decay accelerating and cofactor activity	Plasma
Factor H	Binds to C3b; has decay accelerating activity of the AP C3 and C5 convertases and cofactor activity	Plasma
Thrombomodulin	Increases CFH cofactor activity, activates TAFI-mediated C3a and C5a inactivation	Membrane-bound
Factor I	Degrades C3b and C4b aided by cofactors	Plasma
CD59	Blocks the C9 association with C5b-8 to prevent C5b-9 formation on host cells	Membrane-bound
S-protein (vitronectin)	Binds to C5b-7 and inhibits C9 polymerization	Plasma
Clusterin (SP-40,40)	Binds to C5b-7 and inhibits generation of C5b-9	Plasma

Abbreviation: TAFI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor.

Tableau 1 : Principales protéines régulatrices de la cascade du complément, d'après Noris et al. (15)

5- Complément et pathologies

Comme expliqué ci-dessus, le complément joue un rôle crucial dans la défense contre les pathogènes. Cependant, une dérégulation du système de complément joue un rôle dans la pathogénie de nombreuses affections (auto-immunes, infectieuses, hématologiques, etc...)

Sommairement, nous pouvons distinguer deux situations : un défaut d'activation ou une hyperactivation de la cascade du complément.

a- Infections

D'une part, les déficits en protéines de la voie alterne du complément, telles que la properdine (stabilisateur de la C3 convertase alterne) ou en composants de la voie finale commune peuvent entraîner une susceptibilité accrue aux infections, notamment par des bactéries encapsulées comme *Neisseria meningitidis* (16).

D'autre part, certains agents infectieux (tel que le SARS-CoV-2) peuvent induire une activation du complément entraînant des conséquences tissulaires. Ainsi, l'activation de la voie des lectines (par la protéine N du SARS-CoV-2, *via* MASP-2) et de la voie alterne (*via* la protéine S) est impliquée dans l'orage cytokinique décrit dans la COVID-19 (17).

b- Lupus érythémateux disséminé

L'implication du complément (et notamment le rôle de la voie classique) dans la physiopathologie du lupus érythémateux disséminé (LED) est bien identifiée (18,19).

Bien que rare, le déficit génétique en C1q entraîne un développement de LED dans 90% des cas (20,21), et la présence de certains variants de C1q est associée à la présence d'une photosensibilité ou d'une néphropathie lupique (22). La présence d'anticorps anti-C1q pourrait être impliquée dans le défaut de clairance des corps apoptotiques (mimant un déficit génétique en C1q) et est un marqueur prédictif de néphropathie lupique (23). Par ailleurs, d'autres protéines de la cascade d'activation du complément sont impliquées dans le développement du LED. Par exemple, des mutations du facteur H et de CD46 (ou MCP pour *membrane cofactor protein*) pourraient être impliquées dans les formes précoces de LED (21). Ainsi, un déficit en certaines protéines du complément (génétique ou acquis par la production d'auto-anticorps), favorise l'apparition d'un LED.

D'autre part, le dépôt tissulaire des complexes immuns lié à la présence d'auto-anticorps associés au LED induit l'activation de la voie classique du complément, ce qui majore les dégâts tissulaires. Ceci se traduit entre autre sur le plan sérique par une consommation du C4.

La boucle d'amplification de la voie alterne joue également un rôle dans la formation et le développement des lésions endothéliales et tissulaires, notamment rénales (24).

c- Hémoglobinurie paroxystique nocturne

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est due à l'expansion de cellules souches hématopoïétiques clonales présentant une mutation somatique du gène PIG-A (25). Cette dernière entraîne un déficit d'expression de la molécule d'ancrage glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), résultant en un défaut d'ancrage de protéines à la membrane cellulaire ; notamment de 2 protéines inhibitrices du complément : CD55 (DAF - decay accelerating factor) et CD59 (MIRL - membrane inhibitor of reactive lysis).

L'absence de ces protéines régulatrices rend les globules rouges susceptibles à la lyse médiée par le complément car leur membrane est dépourvue d'autres protéines régulatrices (MCP par exemple), entraînant une hémolyse chronique, et des complications thrombotiques dans divers territoires (syndrome de Budd-Chiari, et thrombose du système nerveux central) (25).

d- Syndrome hémolytique et urémique

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) est une microangiopathie thrombotique définie par la triade : insuffisance rénale, anémie hémolytique mécanique et thrombopénie. La classification des SHU en fonction de l'étiologie distinguait le

SHU typique, secondaire à une infection par *E.coli* producteur de Shiga-toxine, par *Streptococcus pneumoniae* ou par le virus *H1N1/influenza 1*, et le SHU atypique, lié à une anomalie de la voie alterne du complément (26) . En réalité, il semblerait que la cascade du complément soit aussi activée dans le SHU typique (27). Néanmoins, en cas de SHU atypique, les conséquences physiopathologiques résultent directement d'une activation non contrôlée de la voie alterne du complément.

Les principaux régulateurs de la voie alterne impliqués dans la physiopathologie du SHU atypique sont le facteur H, le facteur I et MCP. Des anticorps anti-facteur H sont mis en évidence chez 10% des patients atteints de SHU atypique (28). Les mutations inactivatrices des gènes *CFH* (codant pour le facteur H), *MCP*, et *CFI* (codant pour le facteur I) sont retrouvées respectivement dans 20 à 30%, 9% et 8% des cas.

Moins fréquemment, des mutations gain de fonction du facteur B et de C3 sont en cause (29). Le C3 muté perd sa capacité de se lier aux protéines de régulation, il se lie donc au facteur B pour former la C3 convertase alterne (30).

e- Autres pathologies

La vascularite urticarienne hypocomplémentémique est une vascularite causée par les complexes immuns, impliquant l'antigène C1q et des anticorps anti-C1q ; ce dernier étant un élément majeur du diagnostic (6).

Les cryoglobulinémies sont des pathologies définies par la présence dans le sérum d'immunoglobulines qui précipitent *in vitro* au froid (température inférieure à 37 °C) et qui entraînent *in situ* l'oblitération des vaisseaux sanguins à l'origine des manifestations de la maladie (31). Deux mécanismes sont impliqués dans la pathogénie : la précipitation de la cryoglobuline et la vascularite médiée par les

complexes immuns. Le C1q peut se lier à des récepteurs au niveau des cellules endothéliales et facilite le dépôt de complexes immuns.

Le système du complément participe aussi à la neuroinflammation et à la démyélinisation exacerbant les symptômes et la progression des maladies telles que la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques (32).

6- Traitements visant le complément

Afin de traiter ces pathologies, divers traitements inhibiteurs du complément ont été développés ces dernières années. Ils sont classés en fonction de leurs mécanismes d'action (Figure 7). Certains de ces traitements sont en cours d'évaluation, d'autres ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). Par exemple, l'éculizumab et le ravulizumab ont l'AMM en Europe pour le traitement du SHU atypique et de l'HPN, et l'avacopan a obtenu en 2022 une autorisation d'accès précoce pour le traitement des patients atteints de granulomatose avec polyangéite ou de polyangéite microscopique.

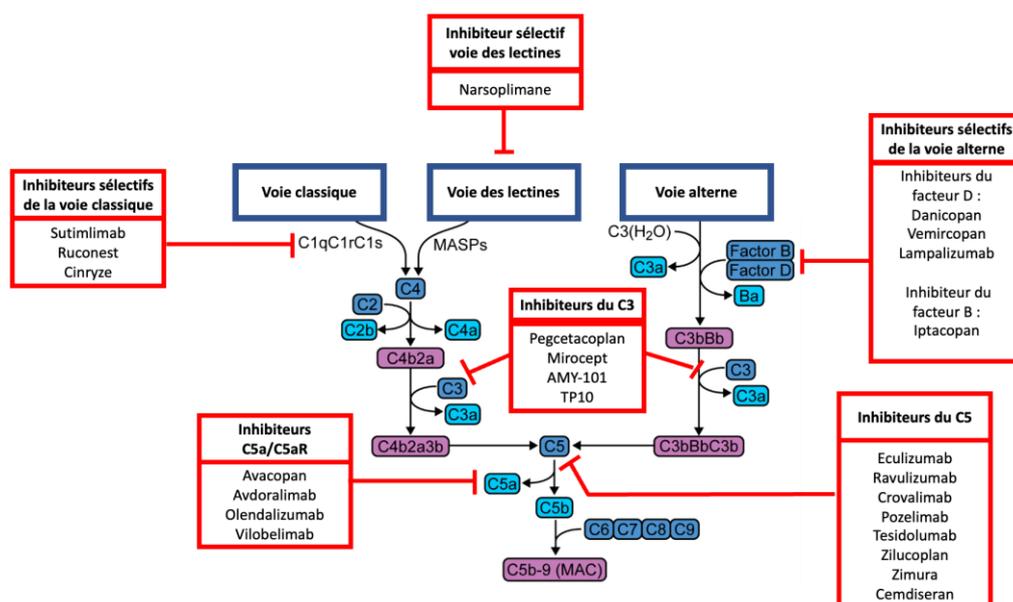


Figure 7 : Inhibiteurs du complément, adapté de Pogossian et al (33).

L'éculizumab, un anticorps monoclonal anti-C5, est le premier traitement inhibiteur du complément ayant obtenu une AMM. Ce dernier se fixe à la région contenant le site du clivage de C5 en C5a et C5b ; bloquant ainsi la formation de l'anaphylatoxine C5a et celle du CAM (via l'inhibition de la formation du C5b). Ce traitement a démontré une réduction significative des évènements thrombotiques et du besoin transfusionnel dans l'HPN (34), ainsi qu'un bénéfice clinique significatif dans le SHU atypique (35).

Plus récemment, l'efficacité du ravulizumab dans le traitement de l'HPN (36) et du SHU atypique (37) a été prouvée. Il s'agit également d'un anticorps monoclonal anti-C5. Comparativement à l'éculizumab, il n'est pas dégradé dans l'endosome et est recyclé par le récepteur néonatal Fc, ce qui allonge sa demi-vie (4 fois plus longue que l'éculizumab), permettant des injections plus espacées dans le temps (38).

Ainsi, l'exploration du système du complément permet d'orienter le diagnostic, le suivi des maladies, la mise en place de traitements étiologiques et le suivi de leur efficacité (40,41).

7- Explorations biologiques du système du complément

a- Bilan de première intention

Le bilan de 1^{ère} intention comprend le dosage des protéines C3 et C4 du complément, ainsi que le Complément Hémolytique 50 (CH50) (42). Le tableau 2 résume les intervalles de référence (communément appelés « valeurs normales ») sur plasma, déterminés au sein du service d'immunologie du CHU de Lille et actuellement utilisés pour ces 3 paramètres (42).

Paramètres	Intervalles de référence	Unités
C3	800-1640	mg/l
C4	120-380	mg/l
CH50	35,4-76,3	U/ml

Tableau 2 : Valeurs de référence C3-C4-CH50, adapté de Lopez et al. (42)

i. C3 et C4

La concentration plasmatique des fractions C3 et C4 peut être mesurée par des techniques automatisées se basant sur l'immunoturbidimétrie ou l'immunonéphélométrie. Au CHU de Lille, les dosages de ces paramètres se font par turbidimétrie sur l'automate OPTILITE® (The Binding Site, Birmingham, UK) avec les réactifs commercialisés par The Binding Site (43). Il faut néanmoins faire attention aux risques d'interférences avec ces méthodes de précipitation en milieu liquide, en particulier avec des prélèvements hémolysés, lactescents ou contenant une concentration importante en complexes immuns.

ii. Complément Hémolitique 50

Le CH50 est un test qui apprécie l'activité fonctionnelle globale de la voie classique et de la voie finale commune. Le test de référence historique mesure la quantité de sérum capable de lyser 50% d'hématies de mouton sensibilisées avec des anticorps de lapin (anti-globules rouges de mouton). Schématiquement, le complexe globules rouges de mouton/antiglobules rouges de mouton correspond à un couple antigène/anticorps et entraîne une activation de la voie classique du complément aboutissant à la formation de CAM à la surface des hématies (44). Cette méthode de référence présente divers

désavantages dont la difficulté d'obtenir des hématies de bonne qualité en plus d'une automatisation et d'une accréditation difficilement réalisables.

La méthode liposomale (45) est une technique alternative automatisée utilisée dans notre laboratoire depuis plusieurs années. Elle consiste à utiliser de liposomes marqués à leur surface par le dinitrophényl (DNP) puis sensibilisés par des anticorps anti-DNP (Figure 8). Ces liposomes contiennent l'enzyme glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Les protéines du système du complément apportées par le sérum ou le plasma du patient se lient aux anticorps anti-DNP, formant des CAM lysant les liposomes. La G6PD est libérée, permettant la conversion du substrat NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide), présent dans le réactif, en NADH, modifiant la coloration du milieu. L'absorbance du milieu est ensuite mesurée par spectrophotométrie, elle est proportionnelle à la quantité de liposomes lysés et donc à la quantité de protéines du complément contenues dans l'échantillon.

Avec la méthode liposomale, nous mesurons donc l'activité totale de la voie classique du complément, et non la quantité de plasma nécessaire pour obtenir 50% d'hémolyse. Cette méthode présente comme avantages d'être standardisée, automatisable, et rapide (40).

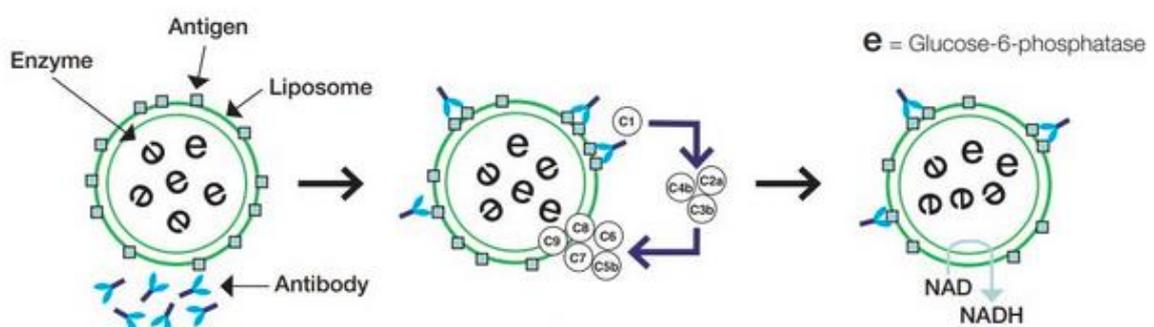


Figure 8 : Principe de la méthode liposomale (46)

b- Bilan de seconde intention

Bien que le bilan de 1^{ère} intention nous permette de nous orienter vers une situation pathologique impliquant le complément (activation de la voie classique ou alterne, inflammation, déficit en fraction du complément, interférence, etc...), il existe des situations rendant l'interprétation des résultats complexe. Il est par exemple difficile de différencier une activation de la voie classique d'une activation de la voie classique associée à celle de la voie alterne, ou de diagnostiquer une activation modérée de la voie alterne. Les intervalles de référence pour les paramètres de 1^{ère} intention étant larges, il peut être difficile de distinguer un cas de valeurs normales basses d'un début d'activation chez un individu avec des valeurs normales hautes (40).

Ainsi, les objectifs des dosages de 2^{nde} intention sont d'améliorer la sensibilité diagnostique et de faciliter l'interprétation des anomalies du bilan du complément.

Il peut donc être utile de doser d'autres protéines du complément, spécifiques de la voie alterne (facteur D, fraction Bb,...), de la voie classique (C1q,...) ou de la voie terminale (C9, sC5b-9,...).

Dans le laboratoire d'immunologie du CHU de Lille, nous dosons en seconde intention deux marqueurs d'activation du complément : le complexe soluble sC5b-9 et la fraction Bb.

i. sC5b-9

Le complexe sC5b-9 est un néo-épitope soluble et non actif du CAM. Il se lie en l'absence d'une membrane cible à la vitronectine au stade de la formation du C5b-7 soluble (10). L'augmentation de sa concentration plasmatique ou sérique est le reflet de l'activation du CAM (47) et donc de l'activation de la voie terminale.

Le test immunoenzymatique MicroVue™ sC5b-9 Plus (Quidel®) (48) permet de mesurer la concentration de sC5b-9 sur le principe d'un test ELISA.

ii. Facteur Bb

Le dosage de la fraction Bb se fait par le kit de dosage enzymatique MicroVue™ Bb Plus (Quidel®). Il permet d'évaluer l'activation de la voie alterne en déterminant la quantité de fragment Bb produite suite au clivage du facteur B.

c- Indications et interprétation des bilans de seconde intention

Les dosages du sC5b-9 et de la fraction Bb du complément fournissent des informations supplémentaires sur l'activation du complément et l'implication éventuelle de la voie alterne. Dans une étude menée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille, l'ajout du dosage de ces 2 paramètres permettait d'interpréter différemment 25 à 30 % des conclusions par rapport à des bilans ne contenant que les paramètres de 1^{ère} intention (40).

Par ailleurs, le dosage du C3, C4 et CH50 peut manquer de sensibilité. En effet, ces derniers ne seront diminués qu'en cas de consommation importante du complément, contrairement à l'augmentation du sC5b-9 et de la fraction Bb. Dans notre expérience, les cinétiques de production et d'élimination du sC5b-9 semblent rapides (40). D'une part, une élévation de cette fraction peut précéder l'altération des paramètres de 1^{ère} intention. D'autre part, il est possible d'avoir des valeurs de sC5b-9 dans les normes alors que les paramètres des explorations de 1^{ère} intention sont encore altérés, par retard de reconstitution des réserves.

Nous réalisons donc ces 2 dosages dans plusieurs situations :

- Dans un premier bilan d'exploration du complément, dans lequel un ou plusieurs des paramètres du bilan de 1^{ère} intention est ou sont diminués. Nous explorons les marqueurs d'activation pour documenter et expliquer l'anomalie observée
- Lorsque la cinétique d'un ou plusieurs des paramètres de 1^{ère} intention diminue fortement par rapport à des valeurs antérieures (même si les valeurs restent dans la norme des intervalles de référence établies par le laboratoire).
- Dans le cadre du suivi d'un patient sous éculizumab. Habituellement, sous éculizumab, le CH50 est indosable. Cependant si ce dernier n'est pas effondré et demeure dosable par nos techniques, nous pouvons explorer la production du sC5b-9.
- Dans le cadre d'une demande de réalisation de ces dosages par le médecin prescripteur.

8- Problématiques

Face à la difficulté d'interprétation des anomalies du complément et aux conséquences sur la prise en charge des patients, il est important de disposer d'intervalles de référence fiables. Pour le sC5b-9 et le facteur Bb, nous utilisons actuellement les intervalles de référence établis par le fournisseur Quidel® (Tableau 3). Selon les fiches techniques de ce dernier, ces intervalles de référence ont été déterminés pour le sC5b-9 et le facteur Bb à partir de respectivement 40 et 36 prélèvements de témoins sains (48,49).

Paramètres	Intervalles fournisseur	Unités
sC5b-9	75-219	ng/ml
Bb	0,49-1,42	µg/ml

Tableau 3 : Intervalles de référence sur plasma EDTA du sC5b-9 et du facteur Bb établis par le fournisseur

Cependant, le CLSI (*Clinical and Laboratories Standards Institute*) (50) et le COFRAC (Comité Français d'Accréditation) recommandent aux laboratoires de biologie médicale de ne pas se contenter des normes établies par les fournisseurs, mais de les vérifier ou d'en établir de nouvelles si celles-ci ne sont pas transférables.

Ce travail a été fait au sein de notre laboratoire pour les paramètres dosés en 1^{ère} intention (C3, C4, CH50) ainsi que pour le C1-INH (42), mais n'a pas encore été réalisé pour le sC5b-9 et le facteur Bb.

Par ailleurs, il est connu que sous certaines conditions pré-analytiques, le complément peut être activé *in vitro*, faussant l'interprétation des résultats (51). Par exemple, les variations de température, les cycles de congélation-décongélation et le temps de conservation sont des paramètres qui peuvent impacter les résultats de dosage. Lopez et al. (52) ont démontré que dans un prélèvement conservé à température ambiante, le complément était activé et que le dosage du CH50 chutait rapidement dans les premières 24 heures. En revanche, dans des conditions de conservation à -20°C, les paramètres C3, C4 et CH50 étaient stables jusqu'à 4 semaines.

Dans notre laboratoire, qui accueille des prélèvements de l'ensemble du CHU de Lille, mais aussi de CH extérieurs, ces conditions pré-analytiques peuvent être variables.

Afin de pouvoir prendre un compte ce biais dans le rendu des résultats et d'en améliorer la pertinence, des tests de stabilité des paramètres de 2^{ème} intention sC5b-9 et Bb sont donc nécessaires.

9- Objectifs

Les objectifs de ce travail sont donc :

- De vérifier la transférabilité des intervalles de référence du fournisseur à notre laboratoire pour les paramètres sC5b-9 et Bb, et si besoin d'établir de nouveaux intervalles de référence propres à notre laboratoire, en prenant en compte les variations entre classes d'âge et de sexe si elles existent,
- D'étudier la stabilité de ces paramètres dans différentes conditions pré-analytiques (cycles de congélation/décongélation, conservation dans différentes conditions de température).

II- Matériel et méthodes

1- Méthodes de dosage des paramètres sC5b-9 et facteur Bb

Dans notre laboratoire, les paramètres sC5b-9 et Bb sont dosés par une méthode immuno-enzymatique de type ELISA manuel, de manière hebdomadaire. Les prélèvements sont décongelés au bain marie à 37°C pendant quelques secondes, puis immédiatement placés sur glace. Pour des raisons pratiques et organisationnelles, les dosages de ces 2 paramètres sont réalisés en parallèle de manière systématique.

Pour le dosage du sC5b-9, le test suit une procédure à 3 étapes (Figure 9) :

- 1.** On utilise une microplaque enduite d'un anticorps monoclonal de souris qui se lie de façon spécifique à l'anneau C9 du sC5b-9. On y dépose le plasma ou le sérum que l'on souhaite tester et le sC5b-9 présent est fixé par les anticorps de la microplaque. Un cycle de lavage est réalisé, éliminant les protéines non fixées pouvant gêner l'interprétation des résultats.
- 2.** Lors de la deuxième étape, des anticorps conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) et dirigés contre le sC5b-9 sont ajoutés dans chaque puits. Ils se lient au sC5b-9 précédemment fixé à la surface des puits. Après incubation, le conjugué non lié est éliminé au cours d'un cycle de lavage.
- 3.** A la dernière étape, un substrat enzymatique chromogène de l'HRP est ajouté dans chaque puits. La réaction se traduit par une coloration bleue. Après incubation, la réaction enzymatique est stoppée chimiquement, ce qui produit une coloration jaune. L'absorbance du milieu de réaction est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'intensité de la coloration du mélange est proportionnelle à la concentration en sC5b-9 dans les échantillons à analyser

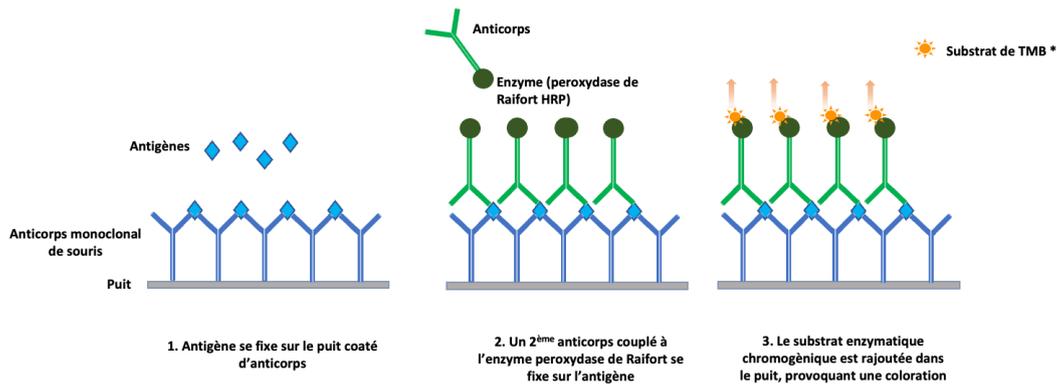


Figure 9 : Principe de la méthode ELISA *

TMB : Tétraméthyle benzidine

Le principe est similaire pour le dosage du facteur Bb, en utilisant des anticorps de capture et de détection dirigés contre le facteur Bb à la place des anticorps dirigés contre le sC5b-9.

La technique utilisée au laboratoire et les réactifs sont commercialisés par Quidel® (Kit Microvue™). Les réactifs pour notre étude étaient issus du même lot pour l'ensemble des dosages. Pour le sC5b-9 le lot utilisé était le 234261 (expiration le 30/06/2024). Pour le facteur Bb, le lot était le 239769 (expiration le 28/02/2025).

Pour les deux paramètres, chaque série de dosages débute par la réalisation d'une courbe de calibration réalisée à l'aide de 5 étalons et d'un « blanc ». Des contrôles de qualité (un niveau bas et un niveau haut) en début et en fin de série permettent de garantir la fiabilité des résultats.

2- Établissement des intervalles de référence

a- Phase pré-analytique et conservation

Au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille, l'exploration du complément se fait sur un tube EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) Vacutainer de 6,0 mL (10,8 mg K₂EDTA, BD Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). L'EDTA permet la chélation du Ca²⁺ qui entraîne un blocage de la cascade de coagulation d'une part et de l'activation du système du complément d'autre part (52,53).

Les échantillons des patients du CHU de Lille arrivent à la réception du laboratoire à température ambiante par un système de transport pneumatique dans les 3 heures suivant le prélèvement. Les échantillons sont ensuite centrifugés puis transférés pour la plupart dans un automate aliquoteur qui génère en moyenne 3 aliquots par tube mère. L'intérêt d'avoir plusieurs aliquots par patient est de limiter le nombre de cycles de congélation-décongélation afin de limiter l'activation *in vitro* du système du complément.

Les prélèvements réalisés en semaine en journée sont pris en charge par l'équipe technique du laboratoire d'immunologie le jour même du prélèvement. En effet les dosages du CH50, C3 et C4 sont réalisés 5 jours sur 7 sur l'automate Optilite® (The Binding Site, Birmingham, UK). La nuit ou le week-end, si le prélèvement est effectué au CHU de Lille, il est aliquoté et conservé à 4°C, s'il provient de l'extérieur du CHU, il est conservé à -20°C.

Pour les paramètres de 1^{ère} intention, un aliquot sur les trois générés par l'aliquoteur est utilisé. Les deux autres aliquots sont conservés à -80°C durant trois mois. Ils sont utilisés si le service prescripteur ou le biologiste veulent rajouter des analyses complémentaires.

Nous avons donc utilisé ces aliquots conservés à -80°C afin d'établir les intervalles de référence pour le sC5b-9 et le facteur Bb.

b- Sélection des patients

Il s'agit d'une étude monocentrique rétrospective qui s'est portée sur des prélèvements pour lesquels un dosage des paramètres de 1^{ère} intention du complément était effectué dans le cadre du soin, à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille, entre septembre 2023 et février 2024.

Pour toute demande de dosage des paramètres de 1^{ère} intention, les prélèvements sont conservés au congélateur à -80°C selon les modalités décrites précédemment.

Les patients à inclure dans l'étude des intervalles de référence étaient sélectionnés selon le processus suivant :

- Pour être inclus les patients devaient présenter des paramètres du bilan de 1^{ère} intention (CH50, C3 et C4) dans les intervalles de référence établis par le laboratoire (42).
- Comme l'accès aux données cliniques et biologiques des patients était indispensable, le patient devait être issu du CHU de Lille et pas d'un CH extérieur.
- Ensuite, les données cliniques et biologiques des patients étaient extraites des bases de données centrales du CHU de Lille (Sillage® pour les données cliniques et Molis® pour les données biologiques) pour vérifier l'absence de pathologie impliquant le complément. Ces données étaient analysées par deux investigateurs du laboratoire afin de sélectionner les prélèvements à analyser en fonction des critères d'exclusion définis ci-dessous. En cas de désaccord sur l'exclusion d'un patient, un troisième investigateur revoyait les données.

Pour être inclus, les patients ne devaient pas présenter une pathologie aiguë ou chronique qui aurait pu modifier les concentrations des protéines du complément. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les critères cliniques et biologiques (hématologiques ou biochimiques) similaires à ceux utilisés pour la détermination des intervalles de référence des analyses du complément de première intention réalisée dans notre service (39).

Les critères d'exclusion sont détaillés dans le tableau 4 :

Catégorie	Anomalies
Critères hématologiques et biochimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Leucocyte < 4.10⁹/l ou > 10.10⁹/l • CRP > 3mg/l • ASAT/ALAT > 100 U/l • GGT > 100 U/L • Présence d'une cryoglobuline
Pathologies infectieuses	<ul style="list-style-type: none"> • Infection bactérienne, virale ou fongique, aiguë ou chronique • Infections récurrentes (bactéries encapsulées)
Pathologies inflammatoires et autoimmunes	<ul style="list-style-type: none"> • Polyarthrite rhumatoïde • Vascularite • Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin • Syndrome de réaction inflammatoire systémique • Syndrome d'ischémie-reperfusion • LED • Syndrome des anti-phospholipides • Myasthénie • Psoriasis • Sclérodémie systémique • Sclérose en plaque
Pathologie impliquant une dérégulation du complément	<ul style="list-style-type: none"> • SHU atypique • Glomérulonéphrite • HPN • Angioedème acquis ou héréditaire
Pathologies neuro-dégénératives	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie d'Alzheimer • Maladie de Parkinson • Dégénération maculaire liée à l'âge
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • Post-opératoire immédiat • Rejet aigu ou chronique (transplantation d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques) • Accident vasculaire cérébral • Infarctus du myocarde • Traumatisme • Brûlures • Syndrome de fuite capillaire

Tableau 4 : Critères d'exclusion

*HPN : hémoglobinurie paroxystique nocturne ; LED : lupus érythémateux disséminé ; SHU : syndrome hémolytique et urémique

Cette étude rentre dans le cadre de la méthodologie de référence MR-004 définie par la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL), et déclarée sous la référence DEC23-143. En accord avec la législation française, la signature d'un consentement éclairé par les patients n'était pas nécessaire. Les patients ont été informés de leur inclusion dans l'étude par courrier postal, accompagné d'un formulaire leur permettant de refuser leur inclusion s'ils le souhaitent.

c- Méthodologie statistique

Les variables qualitatives ont été décrites en termes d'effectifs et de pourcentages et les variables quantitatives en termes de médiane et d'intervalle interquartiles (IQR). La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. En cas de non normalité de la variable d'intérêt (sC5b-9 ou Facteur Bb), une transformation Box-Cox a été appliquée. Les valeurs extrêmes ont été identifiées, puis retirées, selon la méthode de détection de Tukey (54). Les intervalles de référence (2.5^{ème} et 97.5^{ème} percentiles) et les intervalles de confiance à 90% ont été calculés selon la méthode non paramétrique. Le transfert des intervalles de référence existants a été validé en examinant un échantillon de 20 individus de la population de cette étude. Après vérification de la normalité de l'échantillon et de l'absence de valeurs extrêmes, l'intervalle était considéré validé si moins de trois valeurs étaient en dehors de l'intervalle. Dans le cas contraire, un autre échantillon de 20 individus a été étudié : l'intervalle était considéré non transférable si plus de quatre valeurs étaient en dehors de l'intervalle. Les intervalles de référence ont été étudiés à partir des recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP28-A3c (50). Les tests bilatéraux ont été réalisés avec un niveau de significativité de 5%. Les

analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4).

3- Étude de la stabilité

Nous avons également étudié l'impact de plusieurs conditions pré-analytiques sur les résultats de sC5b-9 et Bb. Les conditions choisies avaient pour but de refléter au mieux les situations rencontrées dans notre laboratoire et leur impact potentiel sur les résultats rendus. Les tests ont été réalisés en duplicate (dilutions et dosages).

Les différentes conditions évaluées étaient :

- Impact des cycles de congélation/décongélation
- Stabilité sur sang total à 4°C
- Stabilité sur sang total à température ambiante
- Stabilité sur plasma à 4°C
- Stabilité sur plasma à température ambiante
- Variations quotidiennes chez un même individu sain

Les prélèvements étaient réalisés à J0, J1 et J2 sur tube EDTA par ponction veineuse au pli du coude chez 3 adultes volontaires sains. Ces prélèvements étaient ensuite divisés en tubes de sang total conservés à température ambiante ou à 4°C et en aliquots de plasma conservés à température ambiante, à 4°C, et à -80°C, selon les besoins détaillés plus loin.

Les dosages de sC5b-9 et Bb étaient réalisés selon les recommandations de la fiche technique, notamment en termes de décongélation au bain marie puis conservation sur glace. Le dosage réalisé le jour même du prélèvement servait de mesure de référence. Dans le cas des aliquots de plasma, chaque aliquot n'était utilisé qu'une

seule fois puis jeté. Dans le cas des tubes de sang total, la quantité de sang nécessaire à la réalisation du dosage était déposée dans un tube à hémolyse à partir du tube mère, puis centrifugée pour récupérer le plasma. Ce processus était reproduit pour chaque point de mesure. L'ensemble des résultats est détaillé dans les annexes (respectivement annexe 1 et annexe 2 pour le sC5b-9 et le facteur Bb).

a- Cycles de congélation/décongélation :

Trois aliquots de plasma prélevés à J0 étaient congelés à -80°C immédiatement après prélèvement. Un aliquot était décongelé et recongelé à -80°C 2 fois, puis décongelé une dernière fois pour la réalisation du dosage (3 cycles de congélation/décongélation). Un autre aliquot était décongelé et recongelé à -80°C 1 fois, puis décongelé une dernière fois pour la réalisation du dosage (2 cycles de congélation/décongélation). Le 3^{ème} était décongelé uniquement pour la réalisation du dosage (1 cycle de congélation/décongélation) (Figure 10).

Les étapes de décongélation intermédiaires étaient réalisées en laissant l'aliquot 30 min à température ambiante. La décongélation finale avant dosage était réalisée selon les recommandations de la notice technique.



Figure 10 : Dosages réalisés pour l'étude de la stabilité – Cycle congélation/décongélation

b- Stabilité à 4°C et à température ambiante :

Quatre aliquots de plasma et un tube de sang total étaient prélevés à J0 et conservés à 4°C pour chaque sujet. Un dosage était réalisé immédiatement puis à 24, 48, 72 et 96 heures après prélèvement pour le plasma aliquoté. Un dosage était réalisé à 48, 72 et 96 heures pour le plasma issu du tube de sang total (Figure 11).

Trois aliquots de plasma et un tube de sang total étaient prélevés à J1 et conservés à température ambiante pour chaque sujet. Un dosage était réalisé immédiatement puis à 24, 48, et 72 heures après prélèvement pour le plasma aliquoté. Un dosage était réalisé à 24, 48 et 72 heures pour le plasma issu du tube de sang total (Figure 11).

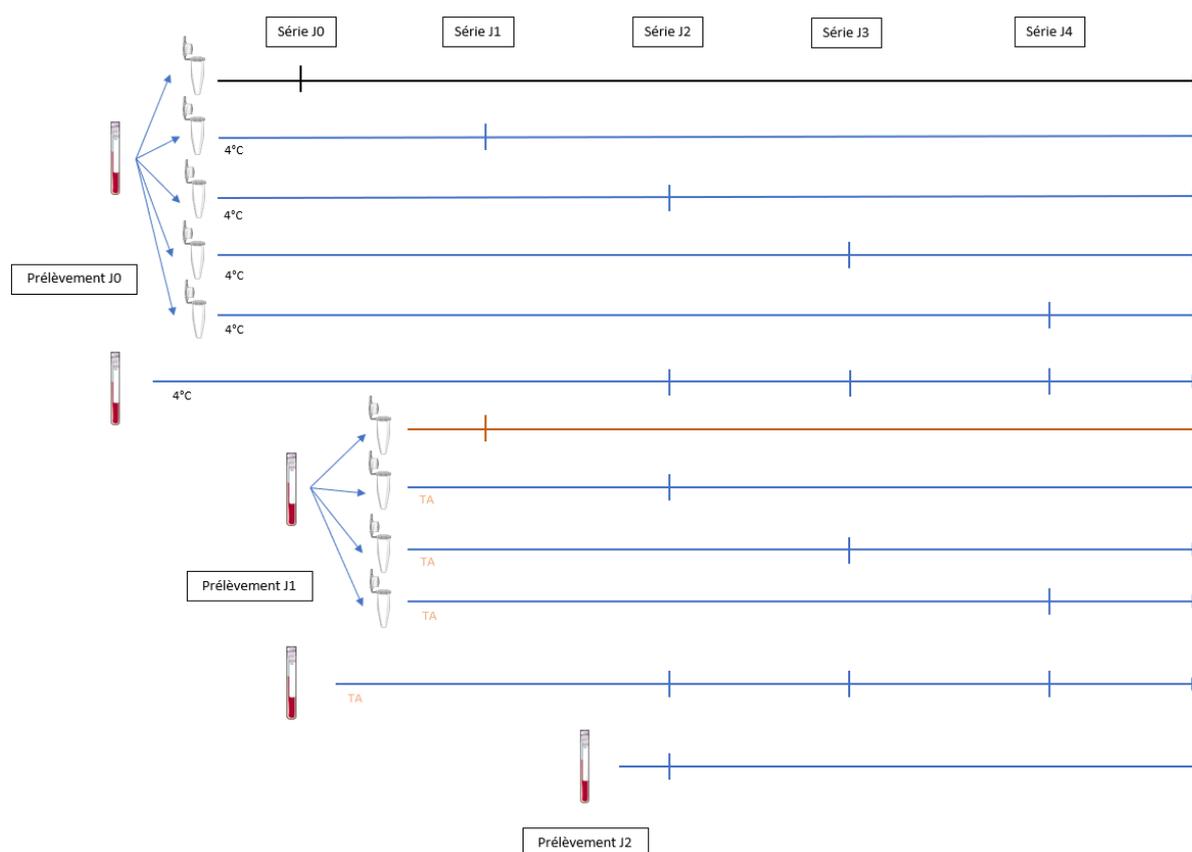


Figure 11 : Dosages réalisés pour l'étude de la stabilité à 4°C et à température ambiante

c- Variations quotidiennes :

Chaque sujet était prélevé à J0, J1 et J2 de l'étude, un dosage était réalisé le jour même du prélèvement (Figure 11).

d- Analyse des résultats

Pour les tests de stabilité, la référence était définie comme étant le dosage effectué le jour même du prélèvement.

Les résultats des dosages dans les différentes conditions pré-analytiques étaient tout d'abord convertis en pourcentage de variation par rapport à la référence, ce qui reflète l'instabilité du dosage défini selon le guide ISO-30 (55).

Pour définir si un dosage s'écartait de manière significative de la référence, nous avons utilisé la méthode de l'*acceptable change limit* (ACL), basée sur une étude de Bastin et al. (56). Il s'agit d'un critère basé sur le coefficient de variation (CV) de la fidélité intermédiaire de la technique, défini dans la norme ISO 5725, chapitre 6 (révisée en 2017) (57) selon la formule :

$$ACL = +/- 2,77 \times CV(\%) \text{ de fidélité intermédiaire}$$

Le tableau 5 présente l'ACL pour les 2 paramètres sC5b-9 et Bb, en se basant sur les CV de fidélité intermédiaire maximaux définis par le fournisseur (48,49).

Paramètres	CV de fidélité intermédiaire maximal	Borne inférieure d'ACL (%)	Borne supérieure d'ACL (%)
sC5b-9	13,1	- 36,3	+ 36,3
Facteur Bb	7,7	- 21,3	+ 21,3

Tableau 5 : Coefficient de variation (CV) de fidélité intermédiaire maximal et bornes d'acceptable change limit (ACL) pour chacun des paramètres.

Les résultats des dosages sont représentés en valeur absolue sous forme de courbe d'évolution au cours du temps, et en pourcentage de variation par rapport à la référence sous forme de dot-plot.

III- Résultats

1- Intervalles de référence

a- Patients inclus

La figure 12 détaille le flow chart des patients inclus. Entre septembre 2023 et février 2024, 4813 bilans contenant au moins un paramètre de 1^{ère} intention (C3, C4 ou CH50) ont été réalisés.

Trois mille deux cent cinquante-cinq (67,6%) proviennent de patients suivis au CHU de Lille. Le bilan de 1^{ère} intention d'exploration du complément pour les patients suivis au CHU de Lille contient toujours au moins les trois paramètres de 1^{ère} intention : C3, C4 et CH50.

Parmi ces derniers, 1130 (34,7%) bilans avaient au moins un paramètre sur les trois avec une valeur en dehors des intervalles de référence. Les dossiers des 2125 patients restants ont été analysés à la recherche des critères d'exclusion définis dans le tableau 4. Parmi les 215 patients n'ayant aucun critère d'exclusion (soit 10% des patients screenés), après information par courrier postal, 5 ont refusé leur inclusion dans l'étude. Nous avons donc utilisé les échantillons des 210 patients restants pour l'étude des intervalles de référence.

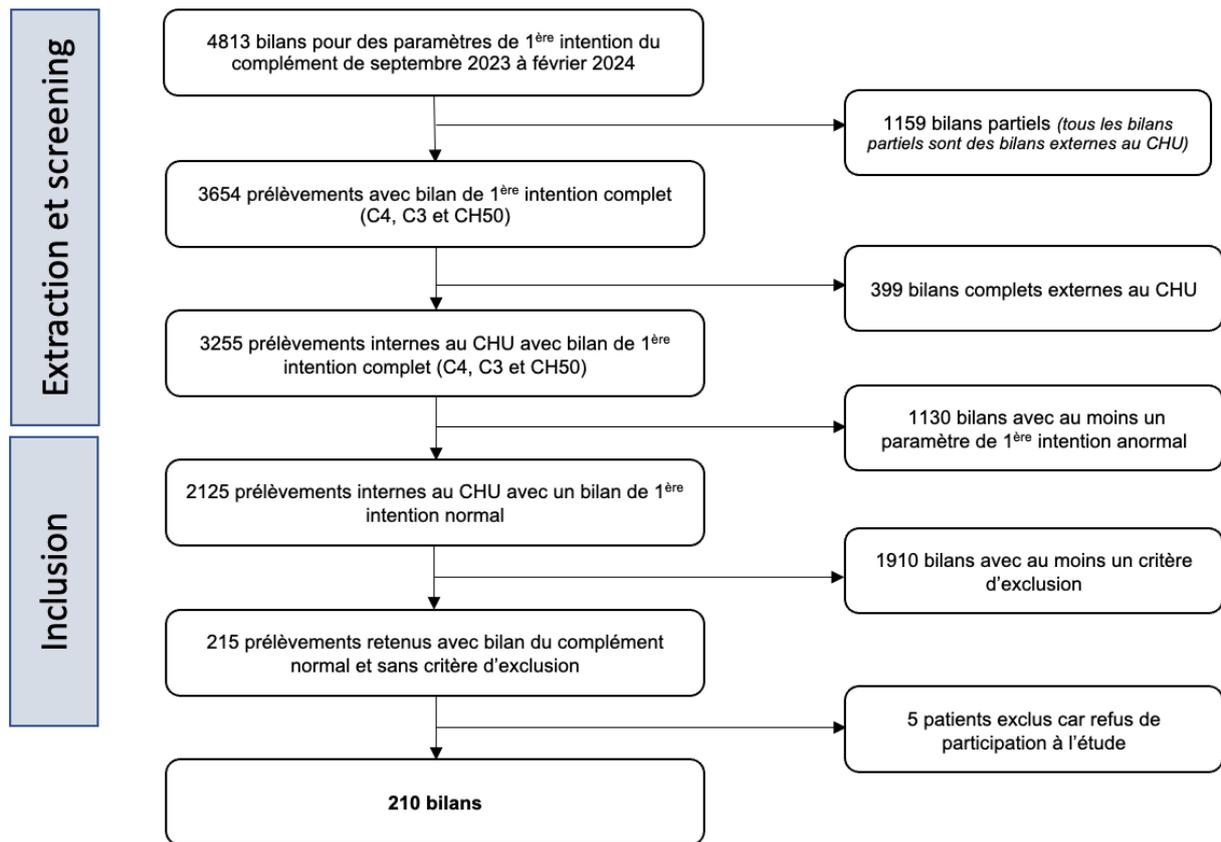


Figure 12 : Flow chart de l'étude

b- Description des patients inclus

Les données démographiques de la population étudiée sont détaillées dans le tableau 6.

L'âge médian était de 43,5 ans [IQR : 33-57] avec un âge minimal de 2 ans et un âge maximal de 84 ans.

La médiane du sC5b-9 était de 182,5 ng/ml [IQR : 141,5-237,0], celle du facteur Bb était de 0,96 µg/ml [IQR : 0,81-1,13].

<u>Variables quantitatives</u>	Médiane	1 ^{er} quartile-3 ^{ème} quartile	Valeur minimale	Valeur maximale
Age (années)	43,5	33-57	2	84
C3 (mg/l)	1102,5	979,3-1220,0	800	1563
C4 (mg/l)	245,5	203,3-294,8	122	377
CH50 (U/ml)	55,5	49,1-61,2	35,6	89,6
sC5b-9 (ng/ml)	182,5	141,5- 237,0	53,0	589
Facteur Bb (µg/ml)	0,96	0,81-1,13	0,46	3,83
<u>Variables qualitatives</u>			n (%)	
Sexe				
Masculin			60 (28,6)	
Féminin			150 (71,4)	
Âge				
> 18 ans			189 (90)	
≤ 18 ans			21 (10)	

Tableau 6 : Description de la population

c- sC5b-9

i. Étude de la transférabilité des intervalles de référence du fournisseur

Le CLSI recommande de vérifier pour chaque paramètre exploré dans un laboratoire la transférabilité des intervalles de référence établis par le fournisseur avant de mettre en place de nouvelles normes. Le principe de transférabilité permet ainsi de valider ou de refuser l'utilisation des normes du fournisseur en s'appuyant sur des prélèvements de routine.

Pour rappel, l'intervalle de référence du sC5b-9 établi pour le kit Microvue™ est le suivant : 75-219 ng/ml.

Après un premier tirage aléatoire de 20 patients parmi les 210 inclus, et après vérification de la normalité de la distribution des 20 valeurs, 3 avaient des valeurs en dehors des intervalles de référence définis par le fournisseur. Un deuxième tirage aléatoire de 20 patients a donc été réalisé ainsi qu'une deuxième vérification de la normalité de la distribution. Sur ce dernier tirage, 10 patients avaient des valeurs en dehors des intervalles de référence du fournisseur. **L'intervalle de référence établi par le fournisseur n'est donc pas transférable pour le sC5b-9, il est donc nécessaire d'établir un nouvel intervalle.**

ii. Établissement d'un nouvel intervalle de référence

Les valeurs du sC5b-9 ne suivant pas une distribution normale (Figure 13), une transformation de Box-Cox a été réalisée.

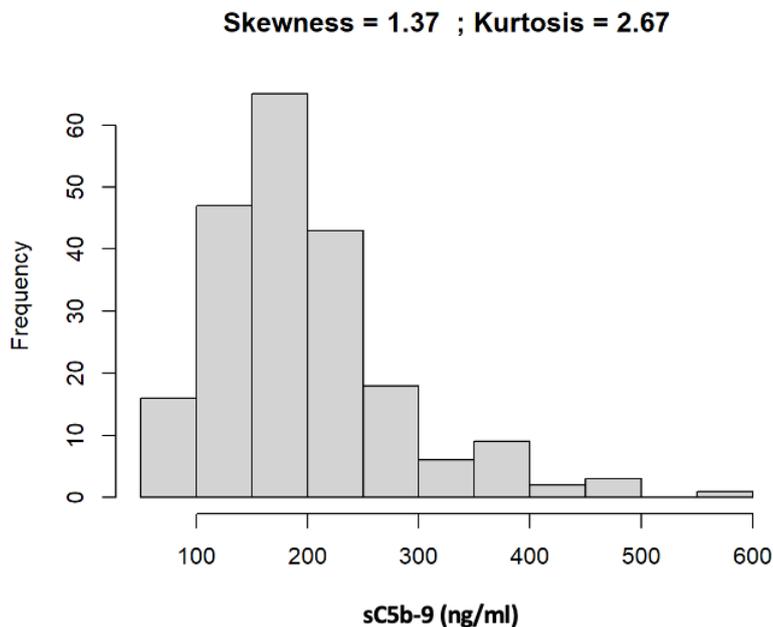


Figure 13 : Distribution des valeurs du sC5b-9 avant transformation

Après vérification de la normalité des données transformées, 3 *outliers* ont été détectés et exclus. Les nouveaux intervalles de référence et leurs intervalles de confiance à 90% (IC90) ont été définis sur les 207 patients restants.

Les résultats sont présentés dans le tableau 7 et la figure 14.

Paramètres	Patients (n)	Limite inférieure de l'intervalle de référence [IC 90%]	Limite supérieure de l'intervalle de référence [IC 90%]	Outliers (n)
sC5b-9 (ng/ml)	207	85 [75 ; 91]	432 [383 ; 472]	3

Tableau 7 : Nouveaux intervalles de référence pour le sC5b-9

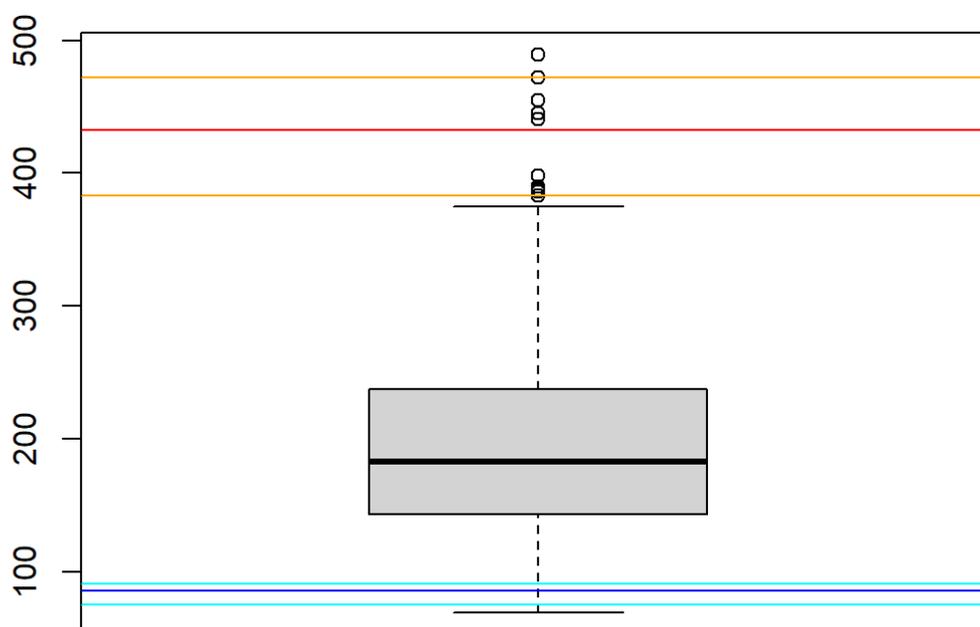


Figure 14 : Présentation de l'intervalle de référence du sC5b-9

Les lignes bleu foncé et rouge représentent respectivement la borne inférieure et supérieure de l'intervalle de référence, les lignes bleu clair et oranges l'intervalle de confiance à 90% de ces 2 bornes

Nous avons par ailleurs analysé de nouveau les dossiers des 3 patients *outliers* afin de nous assurer qu'ils ne présentaient pas de pathologie particulière pouvant entraîner une anomalie du complément (Tableau 8), ce qui n'était pas le cas.

Outliers	Service	Motif d'admission	Diagnostic retenu	Bilan biologique complet *	Valeurs du sC5b-9 (ng/ml)
Patient 1	Ophthalmologie	œdème papillaire unilatéral gauche de découverte fortuite	Disparition de l'œdème; absence de pathologie associée retenue	normal	58
Patient 2	Médecine interne	Phénomène de Raynaud	Absence d'argument pour une pathologie auto-immune	normal	53
Patient 3	Médecine interne	Découverte d'anticorps anti-phosphatidyléthanolamines d'isotype IgM dans le cadre d'un bilan de PMA	Disparition des anticorps; absence d'argument pour un syndrome des antiphospholipides	normal	589

Tableau 8 : Analyse des outliers - sC5b-9

* Bilan biologique complet : NFS, C3, C4, CH50, CRP, bilan auto-immun, bilan hépatique et rénal

Comparativement aux intervalles de référence du fournisseur, ce nouvel intervalle de référence est plus large avec une borne supérieure plus haute.

Nous avons de ce fait analysé en détail les dossiers des 10 patients présentant les valeurs les plus élevées (Tableau 9). Aucun des patients ne présentait de pathologies impliquant le système du complément.

Patients	Service	Motif d'admission	Diagnostic retenu	Bilan biologique complet *	Valeurs du sC5b-9 (ng/ml)
Patient 1	Médecine interne	Rhinoconjonctivite invalidante avec un syndrome sec	Probable rôle de l'oxybutynine dans l'aggravation des symptômes ORL	normal	489
Patient 2	Médecine interne	Angioedème	Angioedème aux IEC	normal	472
Patient 3	Médecine interne	Paresthésies chroniques	Absence d'argument pour une pathologie systémique	normal	455
Patient 4	Médecine interne	Douleurs chroniques	Fibromyalgie	normal	445
Patient 5	Dermatologie	Eruption cutanée	Lucite	normal	441
Patient 6	Médecine interne	Asthénie et céphalées chroniques	Pas de maladie systémique	normal	398
Patient 7	Médecine interne	Asthénie chronique	Pas de maladie systémique	normal	390
Patient 8	Médecine interne	Faiblesse et myalgie	Pas de maladie systémique	normal	388
Patient 9	Maladie du sang	Exploration d'une dysglobulinémie monoclonale IgM lambda	MGUS	normal	386
Patient 10	Gynécologie	Déséquilibre d'un diabète de type 1 au cours d'une grossesse	Déséquilibre du diabète	normal	383

Tableau 9 : Patients présentant les 10 valeurs les plus élevées du sC5b-9

* Bilan biologique complet : NFS, C3, C4, CH50, CRP, bilan auto-immun, bilan hépatique et rénal

d- Facteur Bb

i. Étude de la transférabilité des intervalles de référence du fournisseur

Après un tirage au sort de 20 patients et après vérification de la normalité de la distribution de ces 20 patients, une valeur seulement était en dehors de l'intervalle de référence du facteur Bb établi pour le kit Microvue™ (0,49-1,42 µg/ml).

Pour qu'un intervalle de référence soit considéré comme non transférable, il faut avoir moins de 3 valeurs en dehors de cet intervalle. **Dans le cas du facteur Bb, les normes du fournisseur sont transférables et peuvent donc être utilisées en routine.**

Cependant, ces normes sur plasma EDTA ayant été établies sur seulement 36 témoins sains, et au vu du nombre de prélèvements inclus dans notre étude (pour rappel, le dosage de facteur Bb est réalisé en parallèle de celui du sC5b-9 de manière systématique pour les 210 patients inclus), nous avons tout de même souhaité déterminer notre propre intervalle de référence.

ii. Établissement des nouveaux intervalles de référence

Les valeurs du facteur Bb ne suivant pas une distribution normale (figure 15), une transformation de Box-Cox a été réalisée.

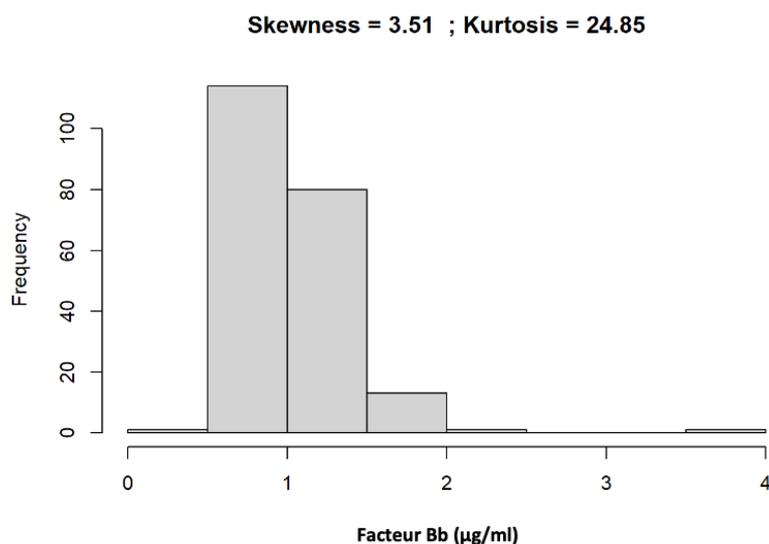


Figure 15 : Distribution des valeurs du facteur Bb avant transformation

Après vérification de la normalité des données transformées, 2 *outliers* ont été détectés et exclus. Les nouveaux intervalles de référence et leurs IC90 ont été définis sur les 208 patients restants.

Les résultats sont présentés dans le tableau 10 et la figure 16.

Paramètres	Patients (n)	Limite inférieure de l'intervalle de référence [IC 90%]	Limite supérieure de l'intervalle de référence [IC 90%]	Outliers (n)
Facteur Bb (µg/ml)	208	0,63 [0,58 ; 0,67]	1,71 [1,58 ; 1,85]	2

Tableau 10 : Intervalles de référence pour le facteur Bb

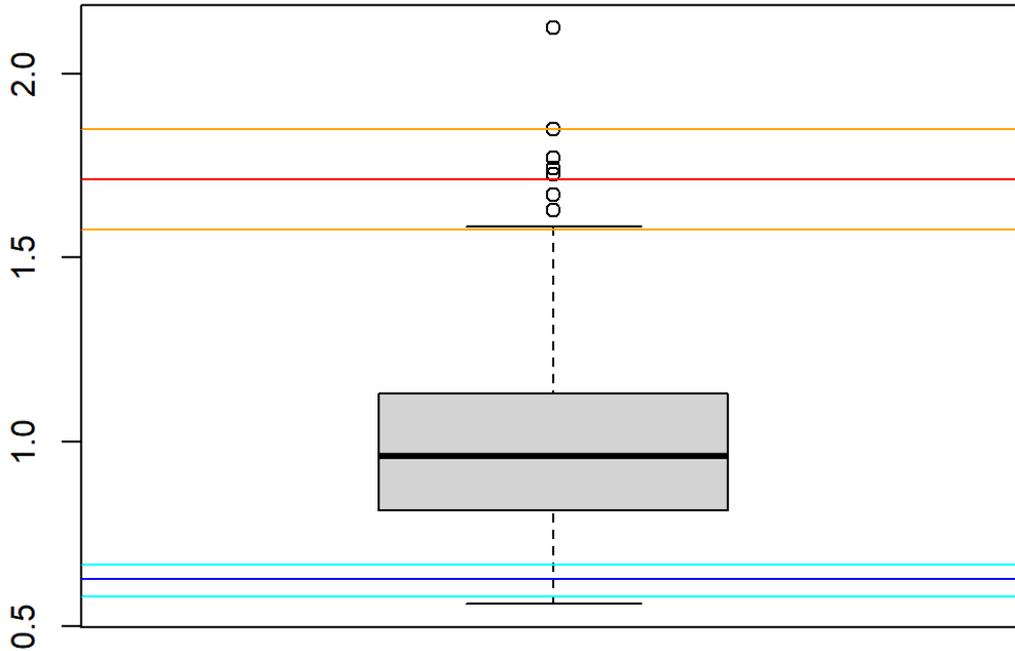


Figure 16 : Présentation de l'intervalle de référence du facteur Bb

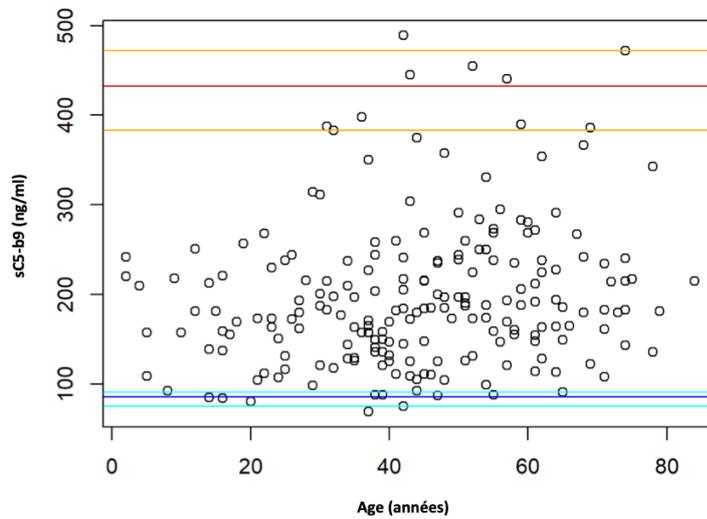
Les lignes bleu foncé et rouge représentent respectivement la borne inférieure et supérieure de l'intervalle de référence, les lignes bleu clair et oranges l'intervalle de confiance à 90% de ces 2 bornes

e- Incidence de l'âge

La répartition graphique des valeurs du sC5b-9 et du facteur Bb (Figure 17) montre une tendance à des valeurs plus élevées du sC5b-9 au-delà de 30 ans.

Cependant, il n'a pas été possible de déterminer s'il était nécessaire d'utiliser des intervalles de références spécifiques en fonction de ces classes d'âge. En effet, nous n'avons pu inclure qu'un effectif réduit de patients de moins de 30 ans (n = 42). Or, les méthodes statistiques recommandées par le CLSI imposent des effectifs d'au moins 120 patients par classe d'âge pour être applicables.

A



B

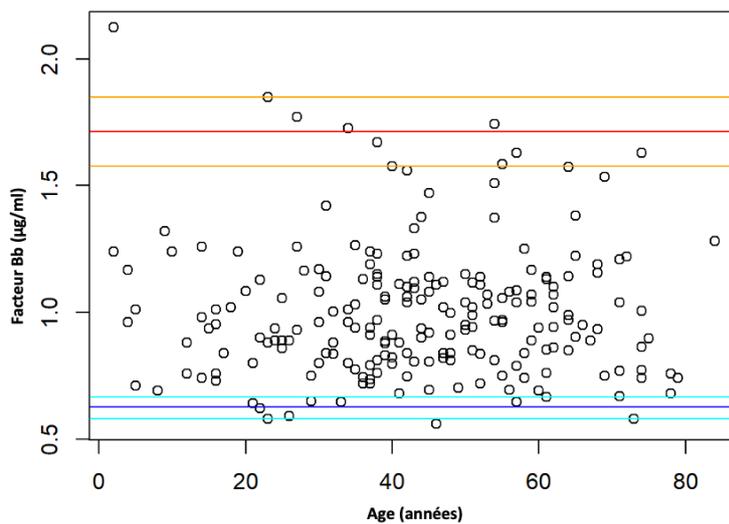


Figure 17 : Valeurs du sC5b-9 (A) et du facteur Bb (B) en fonction de l'âge

Les lignes bleu foncé et rouge représentent respectivement la borne inférieure et supérieure de l'intervalle de référence, les lignes bleu clair et oranges l'intervalle de confiance à 90% de ces 2 bornes

2- Étude de stabilité

Après avoir défini ces nouveaux intervalles de référence, nous nous sommes intéressés à l'impact des conditions pré-analytiques sur la stabilité des paramètres sC5b-9 et Bb.

Sur chaque figure, les résultats des dosages sont représentés en valeur absolue sous forme de courbe d'évolution au cours du temps, et en pourcentage de variation par rapport à la référence sous forme de dot-plot. Les bornes d'acceptabilité pour les deux paramètres sont présentées en bleu (Figure 18 et 19).

Une condition de conservation a été considérée comme inacceptable si au moins une des valeurs dépassait les bornes d'acceptabilité définies. Les bornes d'acceptabilité pour le sC5b9 se situaient entre 63,7% et 136.3% de la valeur du prélèvement basal. Pour le facteur Bb, elles se situaient entre 78.7 et 121.3% de la valeur du prélèvement basal.

a- Cycles de congélation/décongélation

i. sC5b-9

Pour les 3 sujets sains, le dosage de sC5b-9 après 1 cycle de congélation/décongélation est stable (en moyenne, 102.38% du prélèvement basal). Une augmentation linéaire de la moyenne des valeurs de sC5b-9 des 3 prélèvements est visible à partir de 2 cycles de congélation/décongélation (en moyenne, 124.55% du prélèvement basal) avec une valeur qui dépasse le seuil d'acceptabilité (141,01% du prélèvement basal). Après 3 cycles, il existe une augmentation continue (en moyenne, 135.50% du prélèvement basal) mettant en valeur une activation *in vitro* avec une valeur dépassant les bornes d'acceptabilité (146,10% du prélèvement basal). **Pour le sC5b-9, la stabilité du dosage n'est donc garantie qu'avec un seul cycle de congélation/décongélation**

ii. Facteur Bb

Concernant le facteur Bb, les dosages sont stables après 1, 2 et 3 cycles de congélation/décongélation.

Trois cycles de congélation/décongélation ne semblent donc pas impacter la stabilité du facteur Bb.

b- Stabilité à température ambiante

i. sC5b-9

Sur sang total, à température ambiante, le sC5b-9 est stable à 24 heures du prélèvement (en moyenne, 96.9% du prélèvement basal). A 48 heures, les valeurs augmentent mais restent à la limite du seuil d'acceptabilité (en moyenne 129,09% du prélèvement basal). A 72 heures, les valeurs diminuent et demeurent toutes dans les bornes d'acceptabilité (en moyenne, 119,70% du prélèvement basal).

Sur plasma, à température ambiante, le sC5b-9 est stable à 24 heures du prélèvement (en moyenne, 99.28% du prélèvement basal). A partir de 48 heures, nous notons une augmentation importante des valeurs, hors des limites acceptables.

Il est donc possible d'interpréter de façon fiable un dosage de sC5b-9 ayant été conservé à température ambiante jusqu'à 72 heures après le prélèvement s'il s'agit de sang total, mais seulement 24 heures si le prélèvement a été centrifugé et conservé sous forme de plasma.

ii. Facteur Bb

Sur sang total, à température ambiante, le facteur Bb est stable à 24 heures du prélèvement (en moyenne, 104.08% du prélèvement basal). A 48 heures, une valeur dépasse le seuil d'acceptabilité (125.84% du prélèvement basal). A 72 heures, les

valeurs diminuent pour se situer dans les bornes d'acceptabilité (en moyenne 110,27% du prélèvement basal).

Sur plasma, à température ambiante, le facteur Bb est aussi stable à 24 heures du prélèvement (en moyenne, 106.80% du prélèvement basal). A 48 heures, une valeur dépasse le seuil d'acceptabilité (122.01%). A 72 heures, les valeurs diminuent et sont dans les bornes d'acceptabilité (en moyenne 107,26% du prélèvement basal).

Il est donc possible d'interpréter de façon fiable un dosage du facteur Bb ayant été conservé à température ambiante jusque 24 heures après le prélèvement, qu'il s'agisse de sang total ou de plasma.

c- Stabilité à 4°C

i. sC5b-9

Sur sang total, les valeurs se situent dans les bornes d'acceptabilité à 48, 72 et 96 heures après le prélèvement (en moyenne, 91.74%, 115.80% et 91.01% du prélèvement basal respectivement) malgré une augmentation des valeurs à 72 heures. Sur plasma, les valeurs se situent dans les bornes d'acceptabilité jusque 48 heures après le prélèvement (en moyenne, 87.31% du prélèvement basal). A 72 heures, une valeur dépasse ce seuil (139.37%). A 96 heures, les valeurs diminuent et reviennent dans les seuils d'acceptabilité (en moyenne, 89.90 % du prélèvement basal)

Il est donc possible d'interpréter de façon fiable un dosage de sC5b-9 conservé à 4°C jusque 96 heures après le prélèvement s'il s'agit de sang total, mais uniquement jusque 48 heures après le prélèvement s'il est conservé sur forme de plasma.

ii. Facteur Bb

Sur sang total, les valeurs se situent dans les bornes d'acceptabilité à 48, 72 et 96 heures après le prélèvement (en moyenne, 95.78%, 97.82% et 101.22% du prélèvement basal respectivement).

Sur plasma, les valeurs se situent dans les bornes d'acceptabilité à 48, 72 et 96 heures après le prélèvement (en moyenne, 98.15%, 97.96% et 102.43% du prélèvement basal respectivement).

Il est donc possible d'interpréter de façon fiable un dosage du facteur Bb ayant été conservé à 4°C jusque 96 heures après le prélèvement, qu'il s'agisse de sang total ou de plasma.

d- Variations quotidiennes

Pour les 2 analytes, on ne note pas de variation quotidienne significative des valeurs (pour sC5b-9, en moyenne 108.90% et 89.48% du prélèvement basal à J1 et J2, et pour Bb en moyenne 89.5% et 88.77% du prélèvement basal à J1 et J2).

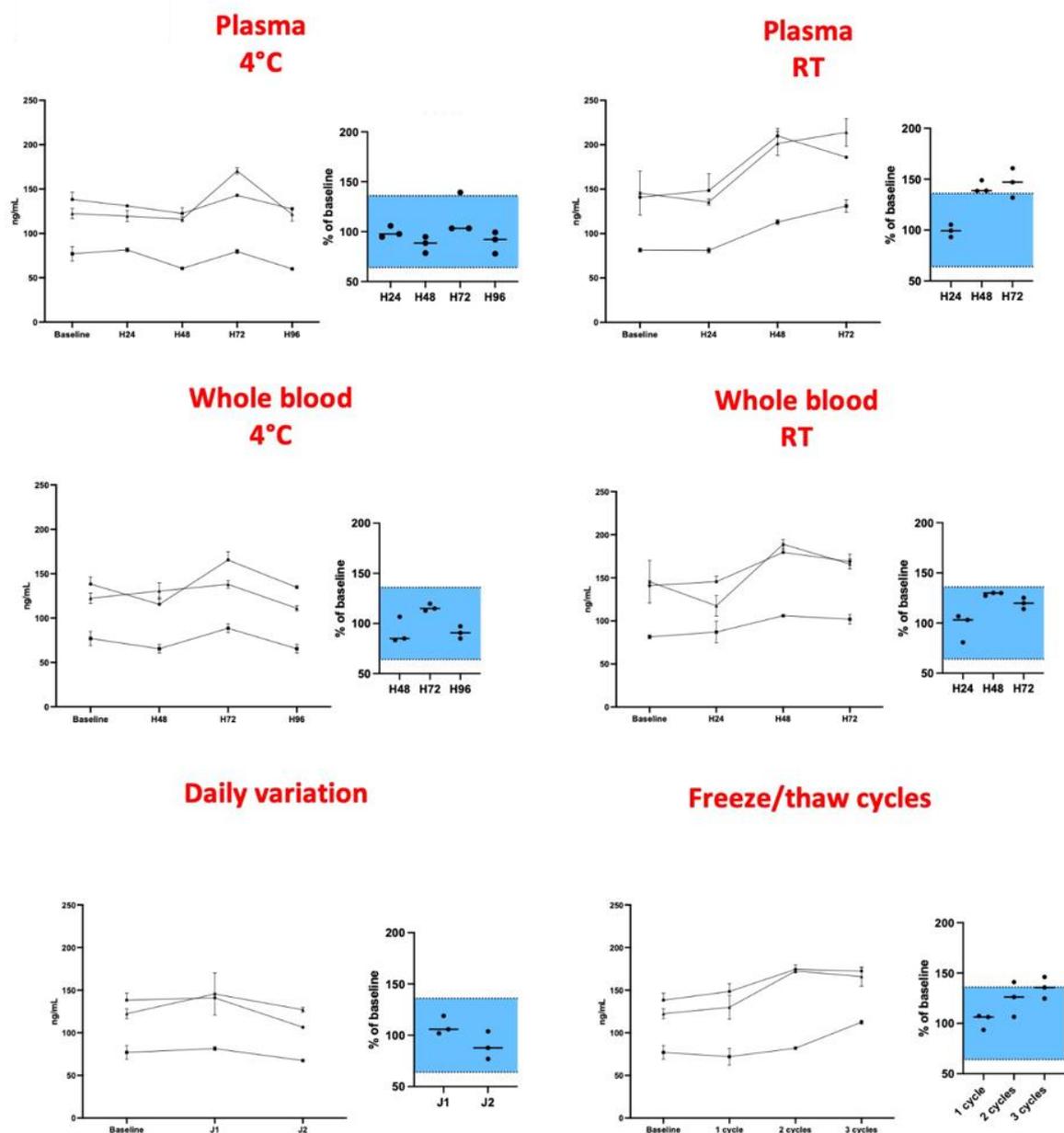


Figure 18 : tests de stabilité pour le sC5b-9

Pour chaque paramètre et chaque condition pré-analytique, sont représentés :- à gauche la concentration du paramètre en fonction du temps de mesure - à droite le pourcentage de variation à la baseline en fonction du temps de mesure, le cadre bleu représente les variations acceptables

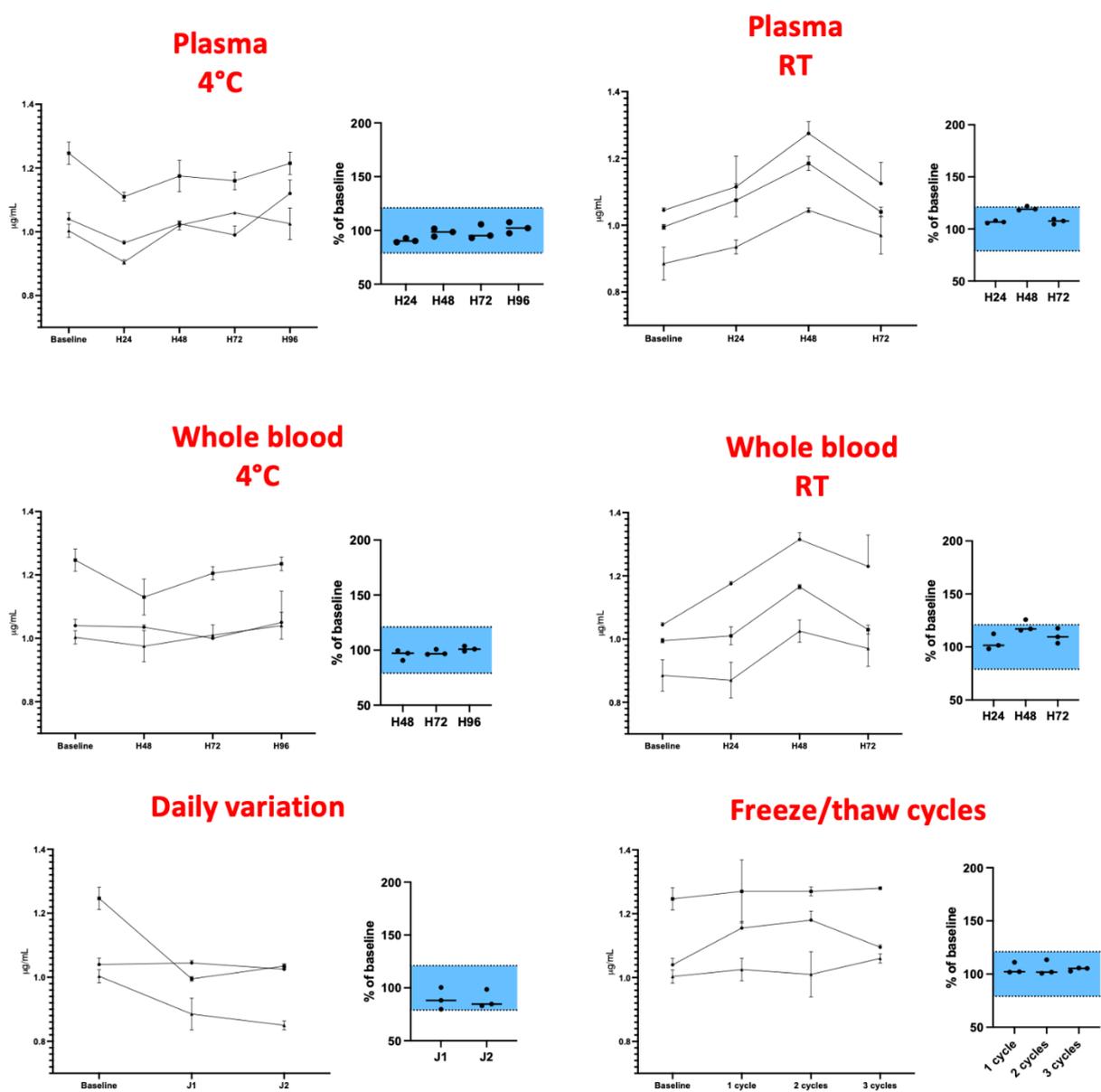


Figure 19 : tests de stabilité pour le facteur Bb

Pour chaque paramètre et chaque condition pré-analytique, sont représentés :- à gauche la concentration du paramètre en fonction du temps de mesure - à droite le pourcentage de variation à la baseline en fonction du temps de mesure, le cadre bleu représente les variations acceptables

IV-Discussion

L'objectif principal de cette étude était double. D'une part, il s'agissait de vérifier, et si besoin, d'établir des intervalles de référence pour des biomarqueurs du système du complément, à savoir le complexe soluble sC5b-9 et le facteur Bb. Ces deux marqueurs sont respectivement des indicateurs de l'activation des voies terminale et alterne du complément, et leur quantification est utile pour mieux caractériser les profils biologiques des patients. D'autre part, l'étude visait à évaluer la stabilité de ces deux paramètres dans différentes conditions pré-analytiques et techniques afin de garantir la fiabilité des résultats obtenus en pratique clinique.

En définissant à la fois des intervalles de référence et les conditions optimales de stabilité, cette étude contribuera à améliorer la précision diagnostique et la standardisation de ces analyses du complément.

1- Échantillons et patients analysés

Notre étude a inclus 210 prélèvements pour établir les intervalles de référence du sC5b-9 et du facteur Bb. Selon les recommandations du CLSI (50), un minimum de 120 prélèvements est nécessaire pour assurer la fiabilité des résultats. Ainsi, notre échantillon répond aux exigences minimales, garantissant une validité statistique. Cependant, bien que ce nombre soit suffisant pour l'analyse globale, il s'est avéré insuffisant pour permettre la création de sous-groupes distincts en fonction de l'âge et/ou du sexe (minimum 120 patients par sous-groupe). En conséquence, nous n'avons pas pu analyser le potentiel impact de ces facteurs sur les intervalles de références de sC5b9 et du facteur Bb. A noter qu'au sein de notre laboratoire, l'étude de Lopez et al. (42) avait démontré que les normes de l'intervalle de référence étaient différentes en fonction de l'âge pour le C1 INH, mais que cette variable n'avait pas

d'impact sur les valeurs du C3, C4 et du CH50. Une étude incluant plus de patients nous permettrait de confirmer ou d'infirmer la tendance graphique observée de valeurs du sC5b-9 plus élevées pour un âge supérieur à 30 ans.

Une limite potentielle de notre étude réside dans la sélection des patients. Premièrement, nous avons travaillé à partir de plasma issu du soin, les résultats auraient été plus représentatifs d'une population saine si les prélèvements étaient issus de dons de sang à l'Établissement Français du Sang (EFS). Cependant, nous ne pouvions garantir le respect rigoureux des conditions pré-analytiques, cruciales pour l'intégrité des marqueurs du complément, et donc l'interprétation des résultats, avec des échantillons obtenus de cette façon. Deuxièmement, notre étude est monocentrique. Ce choix peut introduire un biais de sélection, dans la mesure où les patients de notre établissement peuvent présenter des caractéristiques démographiques, environnementales ou socio-économiques spécifiques, qui ne sont pas nécessairement représentatives de la population générale. Cependant, si nous avons effectué un travail multicentrique, les différences inter-hospitalières dans les pratiques de prélèvement, le transport et les processus analytiques auraient pu influencer les valeurs des marqueurs du complément, limitant ainsi l'applicabilité des résultats à notre centre.

Troisièmement, il est important de noter que les patients inclus étaient principalement des femmes (71,4%). Or, le sexe peut avoir une influence sur les taux des protéines du complément. Une étude menée dans une population caucasienne saine a montré que les valeurs d'AP50 et de C3 étaient physiologiquement plus faibles chez les sujets de sexe féminin par rapport aux sujets de sexe masculin (55).

2- Intervalles de référence

a- sC5b-9

Les intervalles de référence fournis par le fabricant se situent entre 75 et 219 ng/ml. L'intervalle de référence que nous avons établi pour le sC5b-9 au sein de notre laboratoire est de 85 à 432 ng/ml.

Avant la réalisation de cette étude, nous avons déjà observé que les intervalles de référence proposés par le fournisseur semblaient bas dans certains contextes cliniques. En effet, nous observions parfois des taux de sC5b-9 supérieurs à l'intervalle de référence du fabricant, sans observer d'activation sur les paramètres de première intention, ni de signes cliniques d'une pathologie associée au complément. Il est important de noter que les intervalles de référence du fournisseur ont été définis à partir d'un échantillon relativement restreint de 39 témoins sains, ce qui peut limiter la robustesse des valeurs obtenues. Notre étude a permis d'établir un intervalle de référence sur 207 prélèvements, ce qui représente un échantillon bien plus conséquent. Un large échantillon nous permet de mieux capter la variabilité biologique au sein de notre population, et donc de définir des intervalles plus représentatifs.

Comparativement aux intervalles de référence décrits par d'autres laboratoires utilisant les mêmes kits de dosage ; de l'ordre de 300 ng/ml pour la borne haute (59,60), notre intervalle inclut des valeurs plus élevées. Néanmoins, un travail récent sur les tests multiplex de Quidel® retrouve un intervalle de référence (défini par la moyenne \pm 2 écarts type) du sC5b-9 similaire au nôtre : 43-463,5 ng/ml (61). La médiane du sC5b-9 chez 124 sujets sains était de 245.5 ng/ml [IQR = 159.2, 314.7] avec des valeurs allant de 127.0 à 685.8 ng/ml. Il faut néanmoins noter que, bien qu'il s'agisse du même fournisseur dans notre laboratoire et pour ce travail, la technique est différente. Dans

cette étude, le test était réalisé par un ELISA multiplex, permettant d'effectuer des dosages simultanés de plusieurs composants du complément. Il est également délicat de comparer des intervalles de référence entre différents laboratoires, sans connaître l'ensemble des conditions pré-analytiques.

Par ailleurs, nous ne pouvons pas éliminer que les conditions pré-analytiques aient pu influencer sur notre intervalle de référence. En effet, pour cette étude, nous avons utilisé des prélèvements issus de notre activité quotidienne, qui ont ensuite été conservés à -80°C pendant quelques mois (maximum 3 mois). Pour les dosages de sC5b-9 effectués en routine, les prélèvements sont également conservés à -80°C, mais pour une durée plus courte (environ 1 semaine). L'étude de l'impact de la congélation à long terme sur les paramètres sC5b-9 et facteur Bb est en cours de réalisation, elle nous permettra de répondre à cette question. La stabilité des *pools* que nous réalisons pour servir de contrôle de qualité interne semble cependant rassurante sur ce point.

Dans le but d'apporter plus de précision à notre travail et d'assurer la robustesse de nos valeurs de référence, nous avons revu de manière approfondie les dossiers clinico-biologiques des 10 patients présentant les valeurs les plus élevées de sC5b-9. Cette révision des dossiers a permis de confirmer l'absence de signes cliniques évocateurs d'une pathologie impliquant le complément chez ces individus, validant ainsi que ces valeurs plus élevées peuvent être considérées comme étant issues d'individus « sains ». En procédant à cette vérification, nous avons pu consolider la pertinence de l'intervalle de référence proposé.

De plus, nous avons constaté que les médianes des paramètres de CH50, C3 et C4 dans notre population d'intérêt étaient proches de celles décrites par Lopez et al., qui s'est intéressé à une population similaire à la nôtre (respectivement pour notre étude

et celle de Lopez et al., pour le CH50 : 55,5 vs. 54,4 U/mL ; pour le C3 : 1102,5 vs. 1160 mg/L ; pour le C4 : 245,5 vs. 240 mg/L) (42), ce qui renforce la validité de nos résultats. Nous constatons également que les médianes des paramètres de 1^{ère} intention dans notre population sont relativement éloignées de la borne inférieure de leurs intervalles de référence respectifs (pour le CH50 : 55,5 U/mL pour un intervalle de référence entre 35.4 et 76.3 U/mL ; pour le C3 : 1102,5 mg/L pour un intervalle de référence entre 800 et 1640 mg/L ; pour le C4 : 245,5 mg/L pour un intervalle de référence entre 120 et 380 mg/L). Cela va en faveur d'une véritable absence d'activation du complément chez ces patients, même *a minima*.

Du fait des valeurs plus élevées du nouvel intervalle de référence par rapport à celui du fournisseur, son utilisation a une incidence sur l'interprétation des bilans du sC5b-9. Ainsi, en 2023, des dosages sC5b-9 ont été réalisés sur 1381 prélèvements. Le dosage du sC5b-9 était supérieur à 219 ng/ml (intervalle de référence du fournisseur) pour 594 prélèvements, alors que seuls 198 prélèvements objectivaient des valeurs supérieures à 432 ng/ml (nouvel intervalle de référence). Cela représente donc 396 dossiers (28% de tous les dosages) dont les conclusions seraient susceptibles d'être modifiées en appliquant notre nouvel intervalle de référence. Une analyse plus approfondie de ces dossiers, en regardant à la fois les résultats des paramètres du complément de 1^{ère} intention, et les caractéristiques cliniques des patients, sera nécessaire pour bien les caractériser.

D'autre part, l'IC90 de l'intervalle de référence se situe entre 75 et 91 ng/ml pour la borne inférieure, tandis que celui de la borne supérieure varie de 383 à 472 ng/ml. L'intérêt de mesurer ce paramètre est principalement de rechercher une élévation, traduisant une activation du complément. Une question importante se pose alors pour

la pratique clinique : faut-il utiliser le seuil de 432 ng/ml comme borne supérieure de l'intervalle de référence, ou bien adopter le seuil de 383 ng/ml (valeur basse de l'IC90), qui améliorerait la sensibilité mais augmenterait le risque de faux positifs ? Le choix de cette borne supérieure doit être guidé par le type de pathologies à surveiller et de l'importance accordée à l'identification précoce d'une activation du complément.

Par ailleurs, notre intervalle de référence reste relativement large, allant du simple au quadruple entre la borne inférieure et la borne supérieure. De même que pour les intervalles de référence pour le C3, C4 et CH50 (42), cela témoigne d'une variabilité interindividuelle assez importante. Cet intervalle large révèle la nécessité d'une attention particulière à la cinétique du paramètre dans le temps, en confrontant nos résultats avec les données cliniques, et en adaptant nos conclusions en fonction des pathologies sous-jacentes. Il serait ainsi pertinent de réviser la cinétique d'anciens bilans et d'examiner les pathologies associées afin de mieux établir un profil clinico-biologique adéquat pour chaque maladie et sa physiopathologie.

b- Facteur Bb

D'après les analyses effectuées en suivant les recommandations du CLSI (50), les valeurs de référence du fournisseur pour le facteur Bb (0,49-1,42 µg/ml) sont transférables à notre laboratoire. Néanmoins, nous avons choisi d'analyser nos propres données issues de 208 prélèvements. Pour rappel, pour des raisons pratiques et organisationnelles, nous réalisons de façon systématique le dosage de sC5b-9 et Bb en parallèle. L'intervalle de référence que nous avons déterminé est de 0,63 à 1,71 µg/ml, correspondant aux intervalles de référence décrits dans la littérature (62). Le fait de disposer d'un échantillon plus important confère à notre étude une plus grande robustesse et une meilleure représentativité de la population étudiée, avec les

conditions pré-analytiques qui s'y appliquent. L'IC90 de l'intervalle de référence se situe entre 0,58 à 0,67 µg/ml pour la borne inférieure, tandis que celui de la borne supérieure varie de 1,58 à 1,86 µg/ml. Comme le sC5b-9, la question du seuil pour la borne haute se pose : faut-il utiliser la valeur basse de son IC90 pour privilégier la sensibilité ?

3- Tests de stabilité

Les tests de stabilité ont été réalisés sur des échantillons prélevés sur tube EDTA. Comme cité plus haut, l'EDTA permet la chélation du Ca²⁺, limitant par ce biais l'activation du système du complément (52,53).

Les tests de stabilité pour les deux biomarqueurs ont montré une stabilité moindre pour le sC5b-9 par rapport au facteur Bb. La stabilité du dosage de sC5b-9 sur plasma EDTA n'est garantie qu'avec un seul cycle de congélation/décongélation, seulement 24 heures à température ambiante et 48 heures si conservé à 4°C. La stabilité du facteur Bb est meilleure dans toutes les conditions testées. Il est donc important d'être attentifs aux conditions pré-analytiques lors de l'interprétation d'un bilan du complément, notamment en cas d'élévation du sC5b-9 sans explication évidente

Yang et al. (63) mettaient en évidence une stabilité de ces 2 paramètres jusqu'à une conservation de 4 heures à température ambiante et jusqu'à 4 cycles de congélation/décongélation. La discordance entre les résultats de cette étude et la nôtre pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. D'une part, les caractéristiques techniques des réactifs des différents fournisseurs peuvent avoir un impact significatif sur la stabilité et sur les résultats, or nous n'avons pas le nom des fournisseurs des kits ELISA et des réactifs utilisés dans l'étude de Yang et al. D'autre part, la méthode de décongélation utilisée dans les deux études présente des différences notables. Dans

notre étude, nous avons suivi un protocole de décongélation au bain-marie, avec une conservation sur glace (comme recommandé par le fournisseur), tandis que Yang et al. ont testé plusieurs méthodes, notamment la décongélation sur glace, à température ambiante, et à 37°C. Cette variation dans la méthode de décongélation peut avoir des conséquences importantes sur l'activation *in vitro* du complément. Enfin, notre étude applique des critères d'acceptabilité plus stricts, basés sur l'ACL, ce qui permet de définir des bornes précises pour les variations acceptables des résultats. Ce seuil, calculé à partir du coefficient de variation de la fidélité intermédiaire, rend certaines fluctuations inadmissibles dans notre analyse, contrairement à l'approche de Yang et al.

Cela souligne l'intérêt des tests de stabilité pour pouvoir établir des exigences de conditions pré-analytiques spécifiques.

Les tests de stabilité que nous avons réalisés dans cette étude ont été effectués exclusivement sur trois témoins sains. Bien que ces résultats fournissent des informations initiales intéressantes sur la stabilité des paramètres du complément dans des conditions de stockage définies, il serait judicieux d'étendre ces tests à des patients présentant des pathologies impliquant le système du complément. Une étude réalisée chez des patients présentant des microangiopathies thrombotiques (64), a testé la stabilité des composants du complément dans certaines conditions : conservation à température ambiante, à 4°C, après des cycles de congélation-décongélation. La stabilité des facteurs Bb et C5b-9 était garantie jusqu'à 2 heures après le prélèvement ou pendant une nuit à 4°C ou après un cycle de congélation-décongélation.

L'analyse de la stabilité de sC5b-9 et du facteur Bb dans des conditions pathologiques permettrait d'évaluer si l'évolution de ces biomarqueurs est influencée par l'activation

préalable du complément *in vivo*, et ainsi de garantir la validité des résultats dans notre pratique quotidienne. Une future étude prenant en compte ces facteurs serait intéressante.

Enfin, dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas pu évaluer la stabilité des paramètres du complément à long terme (c'est-à-dire, sur plusieurs mois en allant jusqu'à 1 an de conservation) à -20°C et à -80°C , en raison des contraintes de temps. Cependant, des échantillons ont été prélevés et conservés à cette fin, ce qui permettra d'effectuer ces tests ultérieurement (Figure 20).

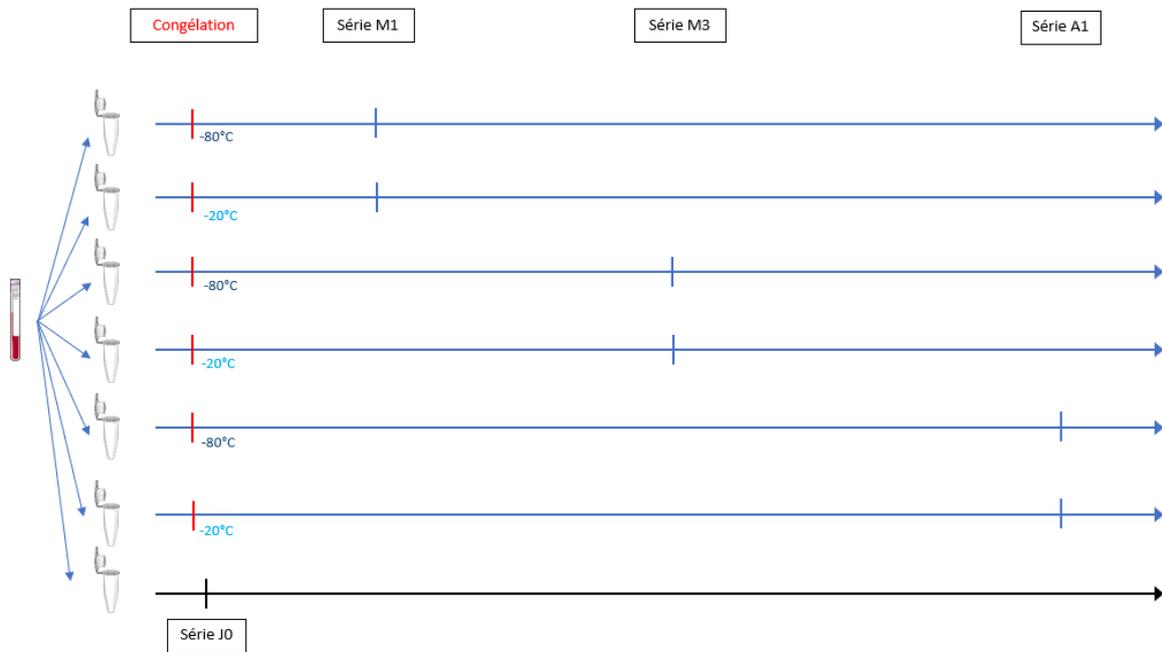


Figure 20 : Dosages à réaliser pour l'étude de la stabilité - Congélation à moyen et long terme

V- CONCLUSION

En conclusion, cette étude a permis d'établir des valeurs de référence pour le sC5b-9 et le facteur Bb, reposant sur un nombre conséquent de prélèvements (207 pour le sC5b-9 et 208 pour le facteur Bb). En revanche, au vu du nombre d'analyses recommandées par le CLSI (n=120), nous n'avons pas pu déterminer la nécessité ou non des intervalles de référence en fonction de tranches d'âge ou du sexe. La détermination de ces nouveaux intervalles de référence, correspondant à la population prise en charge dans notre centre, et à nos conditions pré-analytiques, nous permet d'affiner nos interprétations devant un bilan avec anomalie du complément.

Les tests de stabilité ont révélé que le sC5b-9 était plus instable in vitro par rapport au facteur Bb. Cela renforce la nécessité d'une grande rigueur dans la gestion des conditions pré-analytiques pour les prélèvements sur lesquels seront effectués cette analyse.

Cette étude apporte une contribution importante pour l'interprétation des bilans du système du complément, et pourrait aider à guider le clinicien dans son diagnostic et sa prise en charge. Les résultats obtenus serviront de base à notre pratique quotidienne. Ils pourront aussi être utiles à de futures études visant à explorer la cinétique et l'implication clinique de ces biomarqueurs, notamment dans des pathologies comme les SHU atypiques, le LED, ou encore le suivi des patients sous bloqueur du complément.

Références

1. Daugan M, Noe R, Herman Fridman W, Sautes-Fridman C, Roumenina LT. The complement system: a double edge sword in tumor progression. *Med Sci (Paris)*. 2017; 33(10):871-7.
2. Kareem S, Jacob A, Mathew J, Quigg RJ, Alexander JJ. Complement: Functions, location and implications. *Immunology*. 2023;170(2):180-92.
3. Bardhan M, Kaushik R. Physiology, Complement Cascade. *StatPearls*. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551511/>. Consulté le 08/07/2024
4. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; **11** : 785–797.
5. Mitchell RN. Innate and Adaptive Immunity: The Immune Response to Foreign Materials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, éditeurs. *Biomaterials Science (Third Edition)*. p. 512-33.
6. Rosain J, Ngo S, Bordereau P, Poulain N, Roncelin S, Martins PV, et al. Déficiences en protéines du complément et pathologies humaines. *Annales de Biologie Clinique*. 2014;72(3):271-80.
7. Łukawska E, Polcyn-Adamczak M, Niemir ZI. The role of the alternative pathway of complement activation in glomerular diseases. *Clin Exp Med*. 2018;18(3):297-318.
8. Daugan M, Noe R, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Roumenina LT. Le système du complément - Une épée à double tranchant dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)*. 2017;33(10):871-7.
9. Wijaya C, Burns C, Hall S, Farmer M, Jones D, Rowlandson M, et al. Measurement of Complement Activation via Plasma-Soluble C5b-9 Comparison with Terminal Complement Complex Staining in a Series of Kidney Biopsies. *Kidney Blood Press Res*. 2023;48(1):220-30.
10. Tegla CA, Cudrici C, Patel S, Trippe R, Rus V, Niculescu F, et al. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res*. 2011;51(1):45-60.
11. Chauhan AK, Moore TL. Presence of plasma complement regulatory proteins clusterin (Apo J) and vitronectin (S40) on circulating immune complexes (CIC). *Clin Exp Immunol*. 2006;145(3):398-406.

12. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34-50.
13. Parsons ES, Stanley GJ, Pyne ALB, Hodel AW, Nievergelt AP, Menny A, et al. Single-molecule kinetics of pore assembly by the membrane attack complex. *Nat Commun.* 2019;10(1):2066.
14. Xie CB, Jane-Wit D, Pober JS. Complement Membrane Attack Complex. *Am J Pathol.* 2020;190(6):1138-50.
15. Noris M, Remuzzi G. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol.* 2013;33(6):479-92.
16. Cabon M, Karkowski L, Cinquetti G, Manginot C, Carassou P. Méningite à méningocoque Y par déficit en fraction C6 du complément. *La Revue de Médecine Interne.* 2014;35:A130.
17. Benmansour NC, Carvelli J, Vivier É. Implication de la cascade du complément dans les formes sévères de COVID-19. *Med Sci (Paris).* 1 avr 2021;37(4):333-41.
18. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1601-6.
19. Ayano M, Horiuchi T. Complement as a Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus. *Biomolecules.* 2023;13(2):367.
20. Canet H, Pescarmonat R. Une étiologie rare de lupus érythémateux systémique. *Revue francophone des laboratoires.* 2023; 557 : 74-80
21. Jönsen A, Nilsson SC, Ahlqvist E, Svenungsson E, Gunnarsson I, Eriksson KG, et al. Mutations in genes encoding complement inhibitors CD46 and CFH affect the age at nephritis onset in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(6):R206.
22. Namjou B, Gray-McGuire C, Sestak AL, Gilkeson GS, Jacob CO, Merrill JT, et al. Evaluation of C1q genomic region in minority racial groups of lupus. *Genes Immun.* 2009;10(5):517-24.
23. Chen Z, Wang GS, Wang GH, Li XP. Anti-C1q antibody is a valuable biological marker for prediction of renal pathological characteristics in lupus nephritis. *Clin Rheumatol.* 2012;31(9):1323-9.
24. Jourde-Chiche N, Daniel L, Chiche L, Bertin D, Dumestre-Pérard C, Burtey S, et al. Rôle du complément dans la néphropathie lupique et la néphropathie du syndrome des anti-phospholipides. *La Presse Médicale Formation.* 2022;3(2):156-63.
25. Socié G, Sicre de Fontbrune F, Michonneau D, Peffault de Latour R.

Hémoglobinurie paroxystique nocturne. EMC hématologie. 2016;27(4):1-8.

26. Michael M, Bagga A, Sartain SE, Smith RJH. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 2022;400(10364):1722-40.
27. Buelli S, Zoja C, Remuzzi G, Morigi M. Complement Activation Contributes to the Pathophysiology of Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Microorganisms*. 2019;7(1):15.
28. Moore I, Strain L, Pappworth I, Kavanagh D, Barlow PN, Herbert AP, et al. Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2010;115(2):379-87.
29. Feitz WJC, van de Kar NCAJ, Orth-Höller D, van den Heuvel LPJW, Licht C. The genetics of atypical hemolytic uremic syndrome. *Med Genet*. 2018;30(4):400-9.
30. Frémeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Roumenina L, Dragon-Durey MA, Loirat C. Syndrome hémolytique et urémique lié à des anomalies du complément. *La Revue de Médecine Interne*. 2011;32(4):232-40.
31. PNDS « Cryoglobulinémie ». Cacoub P, Alric L, Arnulf B, Javaugue V, Kone I, Magy L, Musset L, Nocturne G, Pol S, Saadoun D et collaborateurs. Disponible sur: https://www.hassante.fr/upload/docs/application/pdf/202107/pnds_cryoglobulinemies_1.pdf. Consulté le 08/07/2024
32. Saez-Calveral N, Stuve O. The role of the complement system in Multiple Sclerosis: A review. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13:970486.
33. Pogossian A, de Moreuil C, Lemarié C, Rouvière B, Delplanque M, Molina B, et al. Les inhibiteurs du complément : une vue d'ensemble. *La Revue de Médecine Interne*. 2022;43(12):703-12.
34. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008;111(4):1840-7.
35. Legendre CM, Licht C, Muus P, Greenbaum LA, Babu S, Bedrosian C, et al. Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2013;368(23):2169-81.
36. Kulasekararaj AG, Hill A, Rottinghaus ST, Langemeijer S, Wells R, Gonzalez-Fernandez FA, Gaya A, Lee JW, Gutierrez EO, Piatek CI, Szer J, Risitano A, Nakao

- S, Bachman E, Shafner L, Damokosh AI, Ortiz S, Röth A, Peffault de Latour. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study - Blood. 2019;133(6):540-549.
37. Rondeau E, Scully M, Ariceta G, Barbour T, Cataland S, Heyne N, et al. The long-acting C5 inhibitor, Ravulizumab, is effective and safe in adult patients with atypical hemolytic uremic syndrome naïve to complement inhibitor treatment. *Kidney International*. 2020;97(6):1287-96.
38. Quist SW, Postma AJ, Myrén KJ, de Jong LA, Postma MJ. Cost-effectiveness of ravulizumab compared with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the Netherlands. *Eur J Health Econ*. 2023;24(9):1455-72.
39. Prohászka Z, Nilsson B, Frazer-Abel A, Kirschfink M. Complement analysis 2016: Clinical indications, laboratory diagnostics and quality control. *Immunobiology*. 2016;221(11):1247-58.
40. Frémeaux-Bacchi V, Ngo S, Bordereau P, Poulain N, Roncelin S, Blouin J, Roumenina L, Dragon-Durey MA. Exploration du complément : actualités 2012. *Revue francophone des laboratoires*. 2012; 444:31-37.
41. Delage C. Exploration du système du complément : apport des dosages sC5b9 et facteur Bb : expérience de l'institut d'immunologie du CHU de Lille à un an du démarrage de l'activité. Disponible sur: <https://pepите.univ-lille.fr/ori-oai-search/notice/view/univ-lille-36757>. Consulté le 15/07/2024.
42. Lopez B, Bertier N, Ledoult E, Joudinaud R, Maanaoui M, Majerus V, et al. Classical pathway activity C3c, C4 and C1-inhibitor protein reference intervals determination in EDTA plasma. *Biochem Med (Zagreb)*. 2019;29(3):030707.
43. Ghillani P, Dufat L, Sterlin D, Musset L. Évaluation des performances analytiques de l'Optilite® (The Binding Site) : nouvel automate spécialisé pour l'analyse des protéines spécifiques. *Annales de Biologie Clinique*. 2017; 75(1):29-37.
44. Costabile M. Measuring the 50% Haemolytic Complement (CH50) Activity of Serum. *Journal of Visualized Experiments*. 2010;(37):1923.
45. Yoon JG, Park BG, Kwon SS, Song J, Kim HS. Automated CH50 liposome-based immunoassay: consideration in dilution and validation of reference interval. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(10):e309-312.
46. Méthode liposomale. Disponible sur: <https://www.onyva.com.ar/analisisDelComplemento.php>. Consulté le 21/07/2024
47. Frazer-Abel A, Kirschfink M, Prohászka Z. Expanding Horizons in Complement

Analysis and Quality Control. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12:697313.

48. MicroVue™ SC5b-9 Plus EIA;

Disponible sur: <https://www.quidelortho.com/global/en/products/microvue-assays/microvue-sc5b-9-plus-eia>. Consulté le 01/06/2024.

49. MicroVue™ Bb Plus EIA.

Disponible sur: <https://www.quidelortho.com/global/en/products/microvue-assays/microvue-bb-plus-eia>. Consulté le 01/06/2024.

50. Clinical & Laboratory Standards Institute. EP28 A3C: Define and Verify Reference Intervals in Lab. Disponible sur: <https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep28/>. Consulté le 05/08/2024.

51. Brandwijk RJMGE, Michels MAHM, van Rossum M, de Nooijer AH, Nilsson PH, de Bruin WCC, et al. Pitfalls in complement analysis: A systematic literature review of assessing complement activation. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1007102.

52. Lopez B, Rogeau S, Deleplancque AS, Moitrot E, Berthe E, Goulvestre C, et al. Étude de stabilité et mise en place d'un contrôle de qualité externe pour les dosages du complément sur plasma EDTA. *Annales de Biologie Clinique*. 2019;77(6):669-80.

53. Mollnes TE, Garred P, Bergseth G. Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin Exp Immunol*. 1988;73(3):484-8.

54. Tukey, John W.: *Exploratory Data Analysis*. *Biometrical Journal*. 1981; 23(4):413-414.

55. Guide ISO 30:2015. Disponible sur: <https://www.iso.org/standard/46209.html>. Consulté le 21/08/2024.

56. Bastin P, Favresse J, Streel C, Maisin D, Fillée C, Gruson D. Assessment of in vitro stability: a call for harmonization across studies. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(5):e121-4.

57. Guide ISO. 5725-6:1994.

Disponible sur: <https://www.iso.org/standard/11837.html>. Consulté le 21/08/2024

58. Gaya da Costa M, Poppelaars F, van Kooten C, Mollnes TE, Tedesco F, Würzner R, et al. Age and Sex-Associated Changes of Complement Activity and Complement Levels in a Healthy Caucasian Population. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:2664.

59. Martin M, Llorens-Cebria C, León-Román J, Perurena-Prieto J, Perez-Beltran

V, Saumell S, et al. *Ex vivo* C5b-9 Deposition Test to Monitor Complement Activity in Clinical and Subclinical Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and in Transplantation-Associated Thrombotic Microangiopathy. *Kidney International Reports*. 2024;9(7):2227-39.

60. Référentiel des examens (Complexe d'attaque membranaire sC5b9), Site CHU de Liège. Disponible sur: https://www.chu.ulg.ac.be/jcms/c_1917300/fr/complexe-d-attaque-membranaire-du-complement-sc5b-9 Consulté le 21/08/2024.

61. Meuleman MS, Duval A, Grunenwald A, Rezola Artero M, Dermiani M, Peliconi J, et al. Usefulness and analytical performances of complement multiplex assay for measuring complement biomarkers in plasma. *Clin Chim Acta*. 2024;554:117750.

62. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma Complement Components and Activation Fragments: Associations with Age-Related Macular Degeneration Genotypes and Phenotypes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009;50(12):5818-27.

63. Yang S, McGookey M, Wang Y, Cataland SR, Wu HM. Effect of blood sampling, processing, and storage on the measurement of complement activation biomarkers. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(4):558-65.

64. Cataland SR, Holers VM, Geyer S, Yang S, Wu HM. Biomarkers of terminal complement activation confirm the diagnosis of aHUS and differentiate aHUS from TTP. *Blood*. 2014;123(24):3733-8.

Annexes

Annexe 1 : tests de stabilité – valeurs du sC5b-9*

A- Cycles de congélation/décongélation

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				Moyenne % baseline
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J0													
Baseline	137	131	147	138,33	85	77	69	77,00	118	120	129	122,33	
1 cycle	155	142		138,33	85	79		77,00	120	140		122,33	
2 cycles	178	171		138,33	81	83		77,00	174	171		122,33	
3 cycles	170	175		138,33	114	111		77,00	174	158		122,33	
% baseline													
Baseline	99,04	94,70	106,27	100,00	110,39	100,00	89,61	100,00	96,46	98,09	105,45	100,00	100,00
1 cycle	112,05	102,65		107,35	84,42	102,60		93,51	98,09	114,44		106,27	102,37
2 cycles	128,67	123,61		126,14	105,19	107,79		106,49	142,23	139,78		141,01	124,55
3 cycles	122,89	126,51		124,70	148,05	144,16		146,10	142,23	129,16		135,69	135,50

B- Stabilité sur plasma à température ambiante

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				Moyenne % baseline
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J1													
Baseline	145	137		141,00	83	80		81,50	128	163		145,50	
H24	162	135		141,00	79	83		81,50	133	138		145,50	
H48	204	216		141,00	115	111		81,50	211	192		145,50	
H72	186	186		141,00	126	136		81,50	225	203		145,50	
% baseline													
Baseline	102,84	97,16		100,00	101,84	98,16		100,00	87,97	112,03		100,00	100,00
H24	114,89	95,74		105,32	96,93	101,84		99,39	91,41	94,85		93,13	99,28
H48	144,68	153,19		148,94	141,10	136,20		138,65	145,02	131,96		138,49	142,02
H72	131,91	131,91		131,91	154,60	166,87		160,74	154,64	139,52		147,08	146,58

C- Stabilité sur sang total à température ambiante

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				Moyenne % baseline
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J1													
Baseline	145	137		141,00	83	80		81,50	128	163		145,50	
H24	141	150		141,00	96	78		81,50	126	109		145,50	
H48	172	187		141,00	105	107		81,50	185	193		145,50	
H72	175	163		141,00	106	98		81,50	162	170		145,50	
% baseline													
Baseline	102,84	97,16		100,00	101,84	98,16		100,00	87,97	112,03		100,00	100,00
H24	100,00	106,38		103,19	117,79	95,71		106,75	86,60	74,91		80,76	96,90
H48	121,99	132,62		127,30	128,83	131,29		130,06	127,15	132,65		129,90	129,09
H72	124,11	115,60		119,86	130,06	120,25		125,15	111,34	116,84		114,09	119,70

D- Stabilité sur plasma à 4°C

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				Moyenne % baseline
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J0													
Baseline	137	131	147	138,33	85	77	69	77,00	118	120	129	122,33	
H24	131	131		138,33	83	80		77,00	115	124		122,33	
H48	118	127		138,33	61	60		77,00	118	114		122,33	
H72	142	144		138,33	78	81		77,00	173	168		122,33	
H96	128	127		138,33	61	59		77,00	127	116		122,33	
% baseline													
Baseline	99,04	94,70	106,27	100,00	110,39	100,00	89,61	100,00	96,46	98,09	105,45	100,00	100,00
H24	94,70	94,70		94,70	107,79	103,90		105,84	94,01	101,36		97,68	99,41
H48	85,30	91,81		88,55	79,22	77,92		78,57	96,46	93,19		94,82	87,32
H72	102,65	104,10		103,37	101,30	105,19		103,25	141,42	137,33		139,37	115,33
H96	92,53	91,81		92,17	79,22	76,62		77,92	103,81	94,82		99,32	89,80

E- Stabilité sur sang total à 4°C

Valeurs	Témoïn sain 1				Témoïn sain 2				Témoïn sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J0													
Baseline	137	131	147	138,33	85	77	69	77,00	118	120	129	122,33	
H48	110	121		138,33	62	69		77,00	124	137		122,33	
H72	159	172		138,33	92	85		77,00	135	141		122,33	
H96	136	133		138,33	69	62		77,00	109	113		122,33	
% baseline	Témoïn sain 1				Témoïn sain 2				Témoïn sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Moyenne % baseline
Baseline	99,04	94,70	106,27	100,00	110,39	100,00	89,61	100,00	96,46	98,09	105,45	100,00	100,00
H48	79,52	87,47		83,49	80,52	89,61		85,06	101,36	111,99		106,68	91,74
H72	114,94	124,34		119,64	119,48	110,39		114,94	110,35	115,26		112,81	115,79
H96	98,31	96,14		97,23	89,61	80,52		85,06	89,10	92,37		90,74	91,01

F- Variations quotidiennes chez un même individu sain

Valeurs	Témoïn sain 1				Témoïn sain 2				Témoïn sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J0													
Baseline	137	131	147	138,33	85	77	69	77,00	118	120	129	122,33	
J1	145	137		138,33	83	80		77,00	128	163		122,33	
J2	106	107		138,33	67	68		77,00	125	129		122,33	
% baseline	Témoïn sain 1				Témoïn sain 2				Témoïn sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Moyenne % baseline
Baseline	99,04	94,70	106,27	100,00	110,39	100,00	89,61	100,00	96,46	98,09	105,45	100,00	100,00
J1	104,82	99,04		101,93	107,79	103,90		105,84	104,63	133,24		118,94	108,90
J2	76,63	77,35		76,99	87,01	88,31		87,66	102,18	105,45		103,81	89,49

*valeurs exprimées en ng/ml

Annexe 2 : tests de stabilité – valeurs du facteur Bb*

A- Cycles de congélation/décongélation

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne
Baseline = J0												
Baseline	1,06	1,02	1,04	1,04	1,28	1,25	1,21	1,25	1,01	1,02	0,98	1,00
1 cycle	1,14	1,17		1,04	1,2	1,34		1,25	1	1,05		1,00
2 cycles	1,16	1,2		1,04	1,26	1,28		1,25	0,96	1,06		1,00
3 cycles	1,1	1,09		1,04	1,28	1,28		1,25	1,05	1,07		1,00
% baseline												
Baseline	101,92	98,08	100,00	100,00	102,67	100,27	97,06	100,00	100,66	101,66	97,67	100,00
1 cycle	109,62	112,50		111,06	96,26	107,49		101,87	99,67	104,65		102,16
2 cycles	111,54	115,38		113,46	101,07	102,67		101,87	95,68	105,65		100,66
3 cycles	105,77	104,81		105,29	102,67	102,67		102,67	104,65	106,64		105,65

B- Stabilité sur plasma à température ambiante

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne
Baseline = J1												
Baseline	1,04	1,05		1,05	0,99	1		1,00	0,85	0,92		0,89
H24	1,18	1,05		1,05	1,04	1,11		1,00	0,92	0,95		0,89
H48	1,3	1,25		1,05	1,17	1,2		1,00	1,04	1,05		0,89
H72	1,17	1,08		1,05	1,03	1,05		1,00	1,01	0,93		0,89
% baseline												
Baseline	99,52	100,48		100,00	99,50	100,50		100,00	96,05	103,95		100,00
H24	112,92	100,48		106,70	104,52	111,56		108,04	103,95	107,34		105,65
H48	124,40	119,62		122,01	117,59	120,60		119,10	117,51	118,64		118,08
H72	111,96	103,35		107,66	103,52	105,53		104,52	114,12	105,08		109,60

C- Stabilité sur sang total à température ambiante

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne
Baseline = J1												
Baseline	1,04	1,05		1,05	0,99	1		1,00	0,85	0,92		0,89
H24	1,18	1,17		1,05	1,03	0,99		1,00	0,91	0,83		0,89
H48	1,33	1,3		1,05	1,17	1,16		1,00	1	1,05		0,89
H72	1,16	1,3		1,05	1,02	1,04		1,00	0,93	1,01		0,89
% baseline												
Baseline	99,52	100,48		100,00	99,50	100,50		100,00	96,05	103,95		100,00
H24	112,92	111,96		112,44	103,52	99,50		101,51	102,82	93,79		98,31
H48	127,27	124,40		125,84	117,59	116,58		117,09	112,99	118,64		115,82
H72	111,00	124,40		117,70	102,51	104,52		103,52	105,08	114,12		109,60

D- Stabilité sur plasma à 4°C

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne
Baseline = J0												
Baseline	1,06	1,02	1,04	1,04	1,28	1,25	1,21	1,25	1,01	1,02	0,98	1,00
H24	0,96	0,97		1,04	1,1	1,12		1,25	0,9	0,91		1,00
H48	1,03	1,02		1,04	1,21	1,14		1,25	1,01	1,03		1,00
H72	0,97	1,01		1,04	1,14	1,18		1,25	1,06	1,06		1,00
H96	1,09	1,15		1,04	1,19	1,24		1,25	0,99	1,06		1,00
% baseline												
Baseline	101,92	98,08	100,00	100,00	102,67	100,27	97,06	100,00	100,66	101,66	97,67	100,00
H24	92,31	93,27		92,79	88,24	89,84		89,04	89,70	90,70		90,68
H48	99,04	98,08		98,56	97,06	91,44		94,25	100,66	102,66		101,66
H72	93,27	97,12		95,19	91,44	94,65		93,05	105,65	105,65		105,65
H96	104,81	110,58		107,69	95,45	99,47		97,46	98,67	105,65		102,16

E- Stabilité sur sang total à 4°C

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J0													
Baseline	1,06	1,02	1,04	1,04	1,28	1,25	1,21	1,25	1,01	1,02	0,98	1,00	
H48	1,03	1,04		1,04	1,17	1,09		1,25	0,94	1,01		1,00	
H72	0,97	1,03		1,04	1,22	1,19		1,25	1,01	1,01		1,00	
H96	0,98	1,12		1,04	1,25	1,22		1,25	1,01	1,07		1,00	
% baseline	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Moyenne % baseline
Baseline	101,92	98,08	100,00	100,00	102,67	100,27	97,06	100,00	100,66	101,66	97,67	100,00	100,00
H48	99,04	100,00		99,52	93,85	87,43		90,64	93,69	100,66		97,18	95,78
H72	93,27	99,04		96,15	97,86	95,45		96,66	100,66	100,66		100,66	97,83
H96	94,23	107,69		100,96	100,27	97,86		99,06	100,66	106,64		103,65	101,23

F- Variations quotidiennes chez un même individu sain

Valeurs	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	
Baseline = J0													
Baseline	1,06	1,02	1,04	1,04	1,28	1,25	1,21	1,25	1,01	1,02	0,98	1,00	
J1	1,04	1,05		1,04	0,99	1		1,25	0,85	0,92		1,00	
J2	1,02	1,03		1,04	1,04	1,03		1,25	0,86	0,84		1,00	
% baseline	Témoins sain 1				Témoins sain 2				Témoins sain 3				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Moyenne	Moyenne % baseline
Baseline	101,92	98,08	100,00	100,00	102,67	100,27	97,06	100,00	100,66	101,66	97,67	100,00	100,00
J1	100,00	100,96		100,48	79,41	80,21		79,81	84,72	91,69		88,21	89,50
J2	98,08	99,04		98,56	83,42	82,62		83,02	85,71	83,72		84,72	88,77

*valeurs exprimées en µg/ml

AUTEUR : Nom : ASSEM

Prénom : Amine

Date de soutenance : 16/10/2024

Titre de la thèse : Valeurs de référence et stabilité des paramètres du complément sC5b-9 et facteur Bb sur plasma EDTA

Thèse - Médecine - Lille « 2024 »

Cadre de classement : Immunologie

DES + FST/option : Biologie médicale

Mots-clés : sC5b-9, Facteur Bb, Complément, Intervalle de référence

Contexte : Les dosages du sC5b-9 et de la fraction Bb du complément sont d'une aide précieuse pour le diagnostic et le suivi du traitement de nombreuses pathologies impliquant le complément. Face à la difficulté d'interprétation des anomalies du complément, il est important de disposer d'intervalles de référence fiables, et d'effectuer ces dosages dans des conditions pré-analytiques adaptées. Les objectifs de notre travail sont de déterminer des intervalles de référence du sC5b-9 et de la fraction Bb propres à notre laboratoire, et d'étudier la stabilité de ces paramètres dans différentes conditions pré-analytiques.

Méthode : Cette étude monocentrique rétrospective s'est portée sur des prélèvements reçus au CHU de Lille issus de patients ne présentant pas de pathologie modifiant les concentrations des protéines du complément, et dont les paramètres du complément de 1^{ère} intention (C3, C4, CH50) étaient normaux. Les intervalles de référence ont été calculés selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute. Concernant l'étude de stabilité, nous avons étudié l'impact des cycles de congélation/décongélation, et de la conservation à 4°C et à température ambiante, ainsi que les variations quotidiennes chez un même individu sain.

Résultats : Entre septembre 2023 et février 2024, 4813 bilans contenant au moins un paramètre de 1^{ère} intention ont été réalisés. Deux-cent dix prélèvements ont été inclus. L'intervalle de référence pour le sC5b-9 au sein de notre laboratoire était de 85 [75-91] à 432 [383-472] ng/ml, celui du facteur Bb était de 0,63 [0,58-0,67] à 1,71 [1,58-1,85] µg/ml. La stabilité du dosage de sC5b-9 sur plasma EDTA n'était garantie qu'après un seul cycle de congélation/décongélation, seulement 24 heures à température ambiante et 48h si conservé à 4°C. La stabilité du facteur Bb était meilleure que celle du sC5b-9 dans toutes les conditions testées.

Conclusion : Les bornes de l'intervalles de référence du sC5b-9 déterminés par notre étude sont plus élevées que celles du fournisseur, alors que celles du facteur Bb sont sensiblement similaires. De plus, cette étude souligne l'instabilité du sC5b-9 en fonction des conditions pré-analytiques.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Sylvain DUBUCQUOI

Assesseurs : Madame le Professeur Marie FRIMAT

Monsieur le Docteur Benjamin LOPEZ

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Mathieu TRONCHON

Madame le Docteur Aurore COLLET