

Techniques d'exploration du complément

Techniques d'exploration du Complément :

- Pré-analytique
- Exploration du CH50:
 - Technique hémolytique
 - Technique liposomale
- Dosage des protéines du complément:
 - C3c
 - C4
 - C1inh
 - C1q

Pré-analytique

- Tube EDTA:
 - Permet la chélation du Ca pour éviter l'activation du complément.
- Transport au froid des prélèvements
- Conservation des plasmas à -80 ou technique rapide
- Possible sur sérum mais importance de la chaîne du froid en pré-analytique.

Exploration du CH50

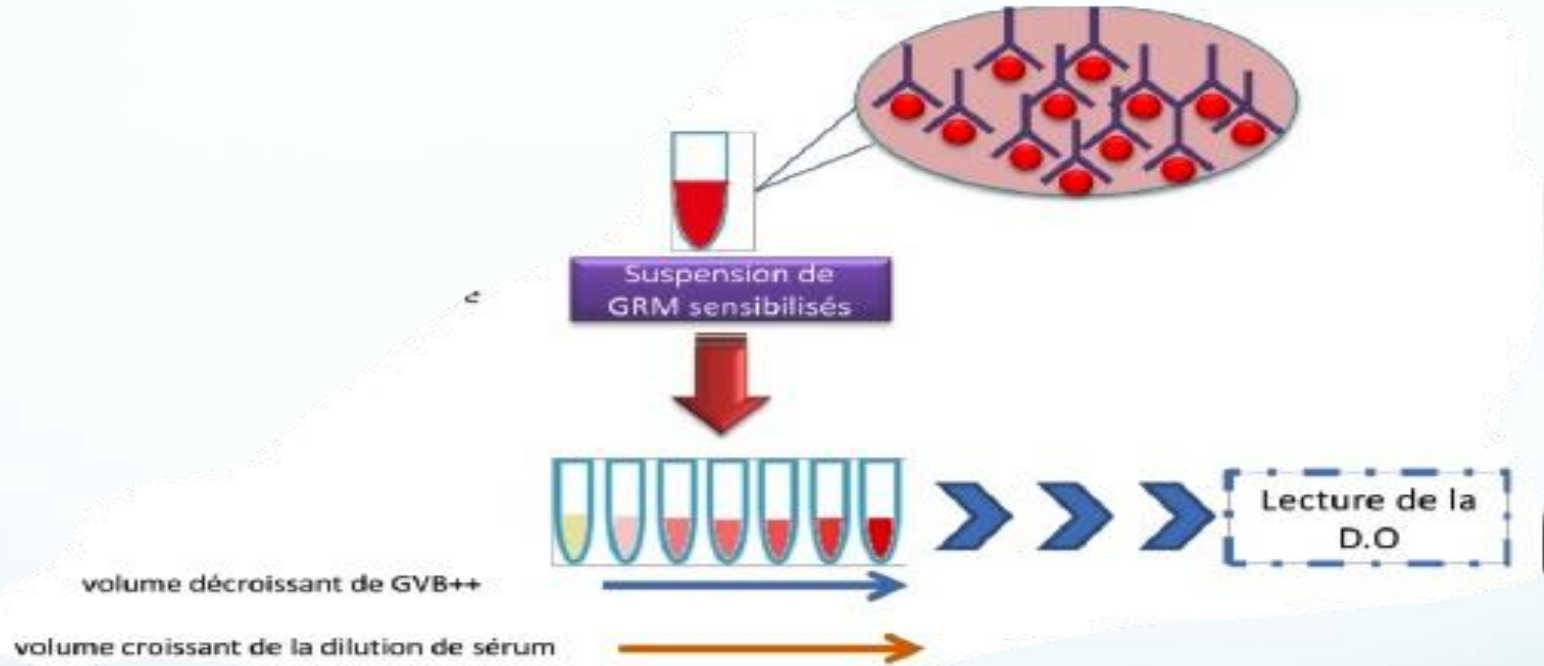
1) Dosage hémolytique:

- Principe :

- Explore l'activité fonctionnelle globale de la voie classique et de la voie finale commune.
- Mesure la lyse d'érythrocytes: GR de moutons sensibilisés par des anticorps de lapin anti érythrocytes.
- Le complexe immunitaire formé active le complément.
- CH50= plus petite quantité de sérum donnant 50% d'hémolyse

→ exprimé en pourcentage par rapport à un témoin constitué d'un pool de plasmas normaux

1) Dosage hémolytique du CH50

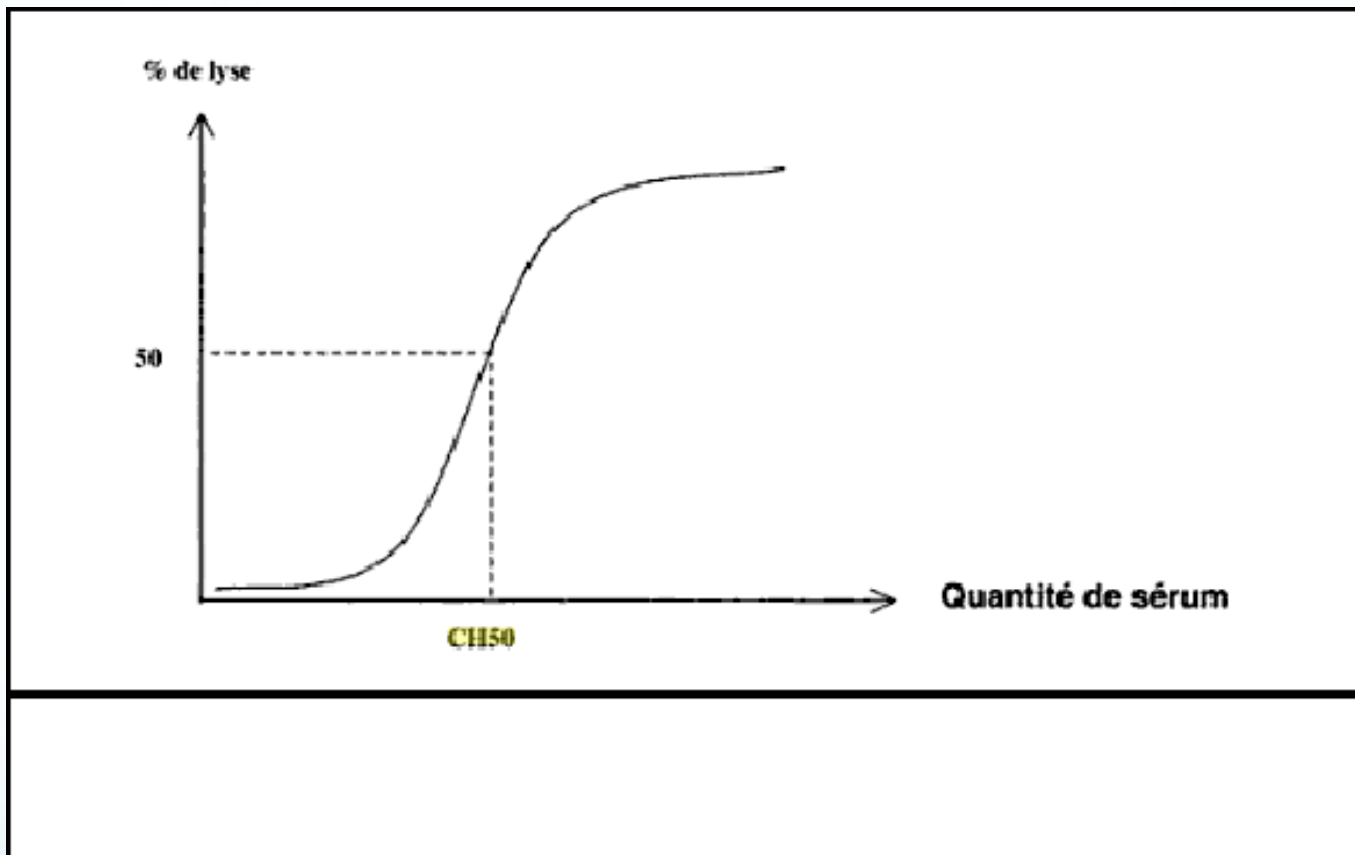


GVB: diluant contenant du Ca et Mg

1) Dosage hémolytique du CH50

- Calcul du titre en CH50:
 - Une courbe avec pour:
 - Abscisse: les concentrations du sérum
 - Ordonnée: le pourcentage de lyse
 - La concentration donnant 50% d'hémolyse est extraite du graphe afin de calculer le titre du CH50
 - $\text{CH50 (Unités /ml)} = 1 / \text{Volume de sérum donnant 50\% d'hémolyse}$

Graphe de l'analyse hémolytique:



1) Dosage hémolytique du CH50

- Technique de référence
 - Longue, compliquée
 - Réactif à base d'hématies instable
 - Difficile à automatiser
-
- CSQ: utilisation de techniques liposomales automatisables

Exploration du CH50



2) Technique liposomale:

- Réalisée au laboratoire.
- Automate SPAPlus, technique rapide: 15mn.
- Principe:
 - Test quantifiant l'activité totale du complément de la voie classique et finale commune.
 - Réaction enzymatique
 - Réactifs:
 - R1=Liposomes (200nm) encapsulant la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase avec DNP à la surface.
 - R2 (Substrat)=Anticorps anti-DNP+ G6P + NAD

2) Technique liposomale:

Mélange du substrat+ R1+ Plasma (6µl)



Ac anti DNP se combinent avec les groupes DNP à la surface des liposomes



Activation du complément



Lyse et Libération de la G6PDH

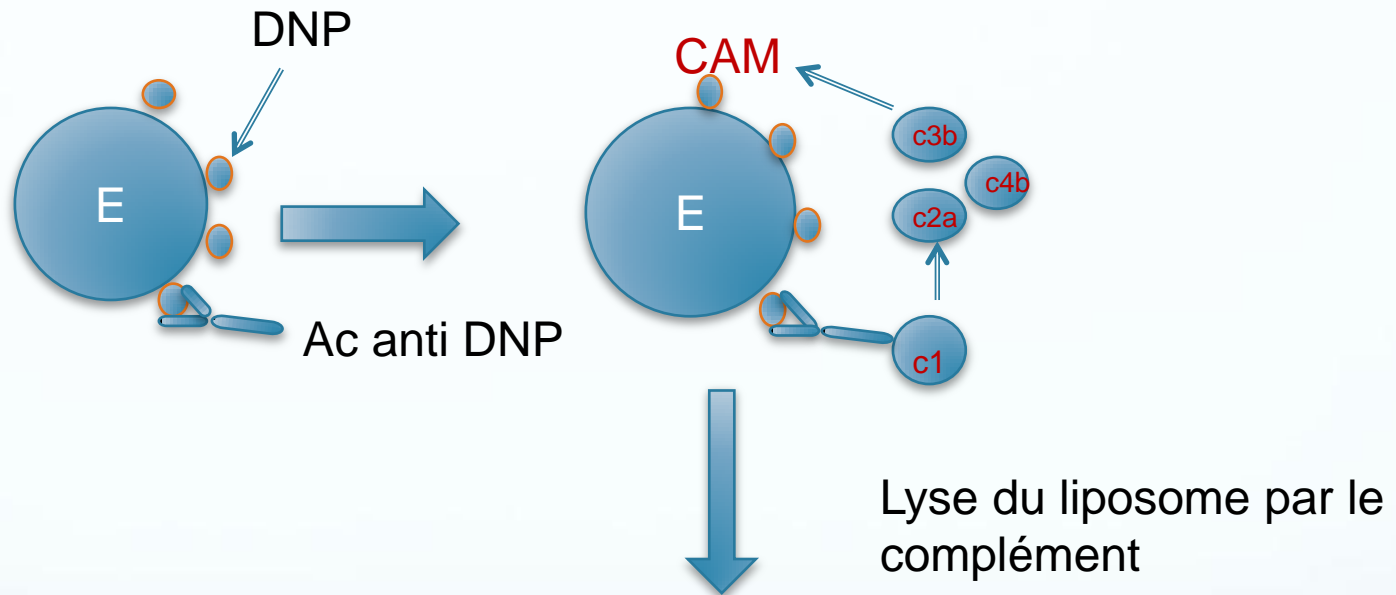


Réaction enzymatique:



Lecture de la DO à 340 nm

2) Technique liposomale:



E= G6PDéshydrogénase



DO à 340nm

2) Technique liposomale:

- Gamme de mesure:

- 12-95 U/mL

- Résultats:

- N: 25-43 UI/ml



Sur le compte rendu apparaît les valeurs de CH50 en % extrapolées à la technique d'hémolyse.

- Interférences:

- Test non applicable pour des échantillons hautement lipidiques, hémolysés
- Taux de complexes immuns circulants important
- Problème lié à l'automate; recul vis-à-vis des valeurs de CH50 (recontrôler si pb)

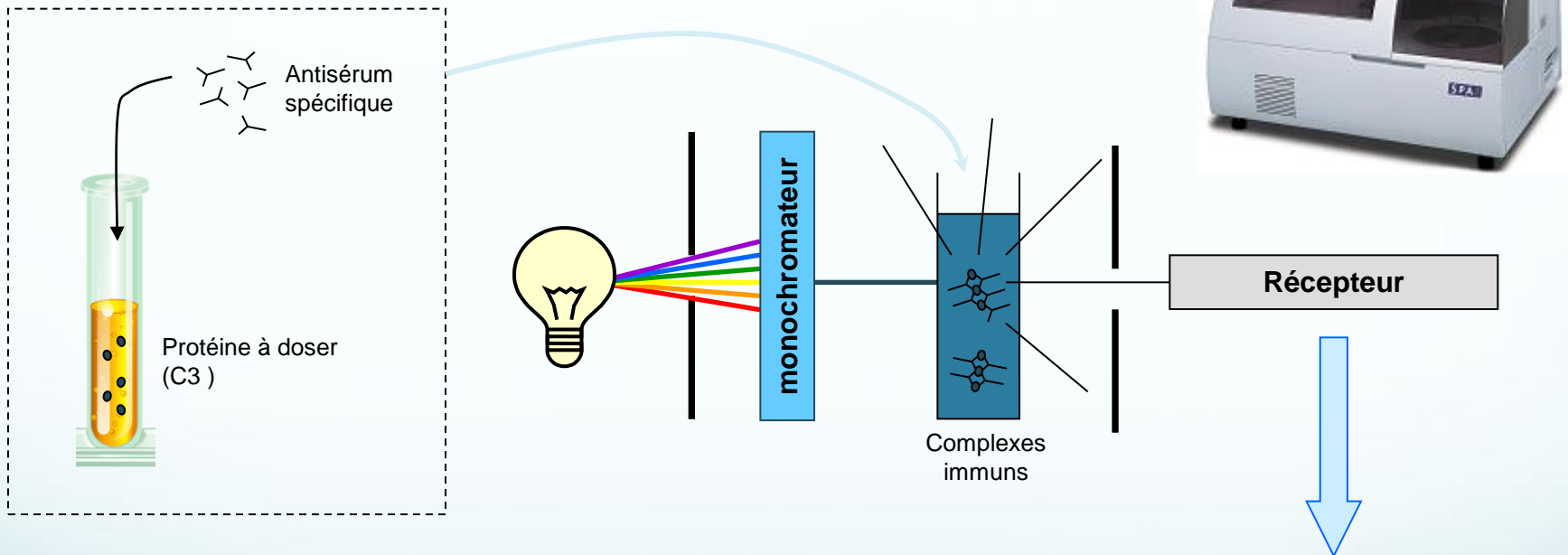
Dosage des protéines du complément

1) C3c:

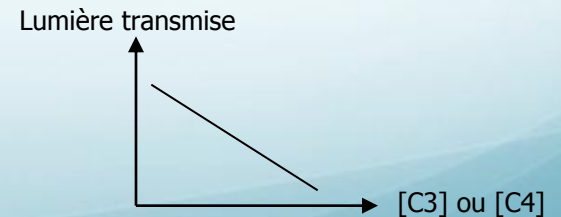
- Dosage quantitatif du C3.
- Réalisé au laboratoire sur le SPAPlus.
- Méthode très sensible.
- C3c:
 - 142 kDa: une chaîne β , α_1 , α_2
 - Une des formes dégradées du C3 (iC3b, C3d, C3f)
 - Cinétique intéressante pour le dosage du C3.
 - Produit par le foie

Dosage C3c

Technique : **Turbidimétrie**



Quantité de **lumière transmise** indirectement proportionnelle à la concentration en protéine spécifique de l'échantillon



Dosage des protéines du complément: le C3c

- Principe: immuno-turbidimétrie

- Automate prélève 20µl de plasma, dilution 1/10.

- Résultats:

- N: 673 - 1683 mg/l

- Gamme de mesure:

- 0.25-3 g/l

- Interférences:

- Protéinurie (fuite de C3)
- Insuffisance hépatique
- Test non applicable pour des échantillons lipidiques, lactescents, hémolysés, taux de complexes immuns circulants importants.

Dosage des protéines du complément:

2) Le C4:

- Dosage quantitatif.
- Réalisé au laboratoire sur le SPAPlus.
- C4:
 - Produit par le foie.
 - Voie classique du complément.
 - Si diminution du C4: exploration de l'inhibiteur du C1q

Dosage des protéines du complément: C4

- Principe: Immuno-turbidimétrie
 - Ac anti C4 forme avec C4 un complexe insoluble
 - Quantité de lumière transmise est indirectement proportionnelle à la quantité de C4 dans l'échantillon.
 - Automate prélève 20µl de plasma, dilution 1/10.
- Résultats:
 - 118 – 399 mg/L
- Gamme de mesure:
 - 0,064 – 0,9 g/L
- Interférences:
 - Insuffisance hépatique
 - Test non applicable pour des échantillons hautement lipidiques, hémolysés, taux de complexes immuns circulants importants.

Dosage des protéines du complément:

3) C1 inhibiteur:

- Serpine
- Rôle d'inhibiteur de plusieurs protéases dans:
 - La voie classique du complément:
 - Inhibe le C1r activé et le C1s activé
 - Le système kallikréine-kinine
 - La coagulation:
 - Inhibe le Facteur XI activé et le Facteur XII activé
 - La fibrinolyse
- 2 types de dosage:
 - Dosage pondéral
 - Dosage fonctionnel

Dosage des protéines du complément: C1inhibiteur

- Dosage pondéral du C1 inhibiteur:

- Réalisé sur le SPAPlus, technique automatisé.
- Indication:
 - Diagnostic des angioœdèmes héréditaires (type 1)
- Principe: immuno-turbidimétrie:
 - Ac anti C1inh forme avec le C1inh un complexe insoluble.
 - La quantité de lumière transmise est inversement proportionnelle à la concentration en protéine dans l'échantillon.

Dosage des protéines du complément: C1inhibiteur

- Dosage quantitatif du C1 inhibiteur:

- Gamme de mesure:
 - Dilution 1/10: 0,06 – 0,4 g/L
 - Dilution 1/20: 0,12 – 0,8 g/L
- Résultat:
 - N: 170 - 573 mg/l
 - Diminué dans 90% des cas d'OAN (= type I), normal dans 10% → **Dosage fonctionnel +++**
- Interférences:
 - Test non applicable pour des échantillons hautement lipidiques, hémolysés, lactescents.
 - Taux de complexes immuns circulants importants.

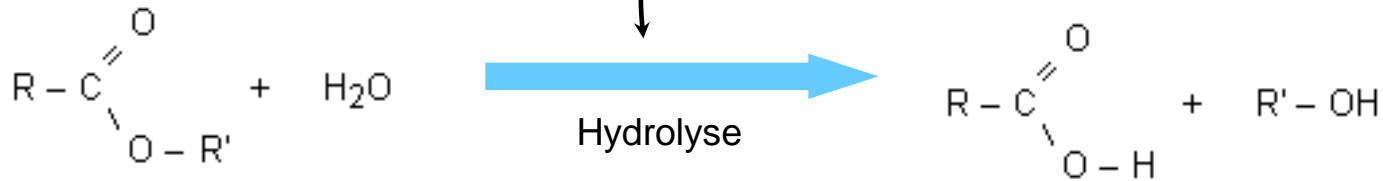
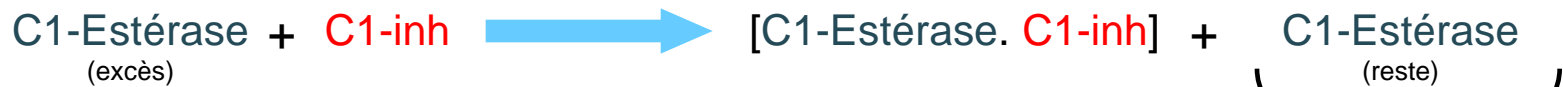
Dosage des protéines du complément: C1inhibiteur

- Dosage fonctionnel du C1 inhibiteur:

- Technique manuelle avec lecture sur ETIMAX
- Indication:
 - diagnostic des angioœdèmes héréditaires (type 2)
- Principe: Dosage immuno-enzymatique

Dosage des protéines du complément: C1inhibiteur

- Dosage fonctionnel du C1 inhibiteur:

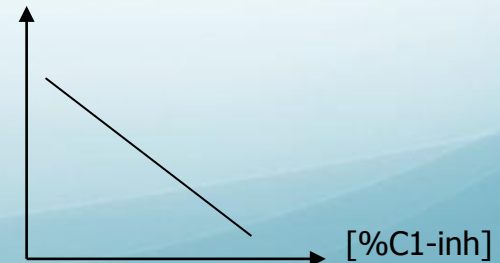


405 nm

Dosage spectrophotométrique

« **Accroissement de l'extinction** » à 405 nm liée à l'activité du C1-inh

Absorbance



Dosage des protéines du complément: C1inhibiteur

- Dosage fonctionnel du C1 inhibiteur:
 - Echantillon dilué au 11^e ou au 22^e si valeur > 115%
 - Domaine de référence:
 - 0.70 – 1.30 U. C1inh (70 – 130 %)

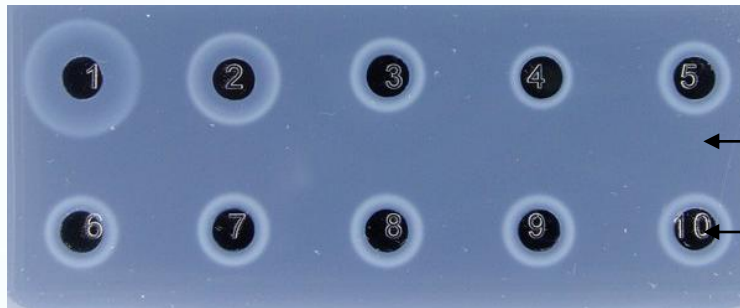
Dosage des protéines du complément:

4) C1q:

- Dosage quantitatif par immunodiffusion radiale.
- Technique manuelle sur 4 jours (réalisée le vendredi jusqu'au mardi)
- Taux réduits dans:
 - LED
 - Maladies des CI
 - Méningites
 - Déficiences héréditaires

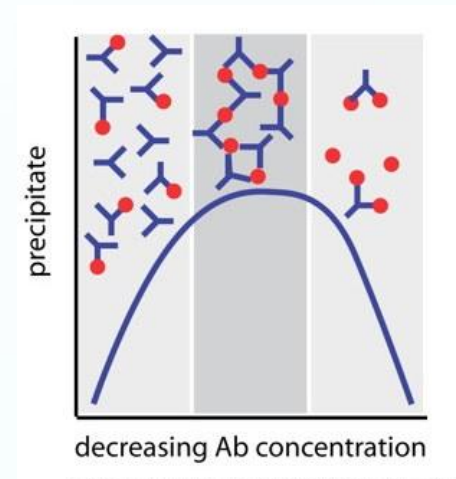
Dosage du C1q

- Immunodiffusion radiale (Mancini)



Gel d'agarose contenant un anticorps anti C1q

Dépôt de l'Ag (C1q) à doser



1 – Diffusion radiale de l'Ag

2 - Formation de complexes Ag-Ac

→ « **Cercle de diffusion** » tout autour du puits jusqu'à la zone d'équivalence

Relation linéaire entre le carré du diamètre de l'anneau de diffusion et la concentration en Ag

