

Etude du système du complément.

Introduction.

La découverte de ce système du complément remonte à la fin du 19^{ème} siècle et fait suite à plusieurs observations concernant l'activité bactéricide de sérum provenant d'animaux immunisés.

Cette activité disparaît après un chauffage (30 minutes à 56°C). L'activité de ces sérums chauffés peut être restaurée par addition de sérum non immun, fraîchement prélevé.

Le sérum non immun est ainsi considéré comme un complément à l'activité bactéricide des anticorps présents dans le sérum immun.

Remarques :

Cette découverte coïncide avec la découverte de la phagocytose par Elie Metchnikoff (en 1880). Il travaillait sur des étoiles de mer dont les cellules mésodermiques pouvaient avaler et dégrader des cellules étrangères (vivantes et inertes).

Pasteur a réalisé le 1^{er} vaccin le 6 juillet 1885.

Le complément était considéré comme une seule substance thermolabile, mais il est apparu comme un système complexe de substances plasmatiques présentes dans tous les sérums, à l'état inactif. L'activation de ce système est consécutive à la pénétration d'un élément antigénique. L'activation aboutit à l'apparition de facteurs activés, solubles, et de facteurs activés, fixés sur des particules antigéniques qui rendent compte de 3 grandes fonctions effectrices de ce système.

- L'opsonisation (très particulièrement) des particules antigéniques,
- Une activité pro-inflammatoire permettant un afflux localisé du système immunitaire,
- Une activité lytique.

I\ Les différents facteurs et voies d'activation.

A\ Nomenclature.

Les protéines solubles plasmatiques de ce système du complément concernent l'activation. Elles peuvent être regroupées en trois grandes unités fonctionnelles :

- Deux unités d'activation, qui, chacune, se caractérise par une série d'étapes protéolytique au cours desquelles, une sérine-protéase (forme proenzyme) est clivée et donne un facteur activé (avec activité enzymatique) qui activera à son tour un autre facteur.
- Une de ces voies est appelée la *voie classique* alors que l'autre voie est la *voie alterne*. Ces voies impliquent des facteurs distincts mais toutes deux génèrent une

même activité enzymatique, liée (fixée) à la surface antigénique (C3C5 convertase). Cette activité va initier la deuxième étape d'activation du complément : la troisième unité fonctionnelle → l'unité effectrice. Cette dernière unité est appelée ainsi car cette étape aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) qui est responsable de la lyse des microorganismes.

1\ Les composants de la voie classique.

Ces composants sont désignés numériquement de C1 à C9. Ils réagissent dans un ordre bien précis : C1 - C4 - C2 - C3 - C5 - C6 - C7 - C8 - C9.

Ce sont des protéines ou des glycoprotéines comportant de 1 à 3 sous-unités polypeptidiques (α , β et γ). L'activation de ces facteurs par des protéases, libère deux types de fragments activés : un fragment de petite taille (forme a) et un grand fragment (forme b). Par exemple, C3 donne C3a (petit) et C3b (grand).

Une exception existe pour C2 où C2a est le grand fragment et C2b est le petit fragment.

2\ Les composants de la voie alterne.

Ces composants sont désignés par des lettres : B, D, H, I et P.

B\ La voie classique.

Insérer doc. page 2.

Cette voie est la voie déclenchée suite à la présence de complexes Antigène/Anticorps (solubles ou particulaires). C'est une voie qui se réalise dans le cadre de la réponse spécifique, adaptative.

Remarque : L'IgG4 n'active pas le complexe.

Cette voie est initiée par la fixation de C1 (C1q) au domaine constant des chaînes lourdes des Ig. : au CH2 des IgG (ont trois domaines constants et un variable) ou au CH3 des IgM (ont quatre domaines constants et un variable).

Remarque : Les IgM interviennent dans la réponse primaire alors que les IgG interviennent plus particulièrement dans la réponse secondaire.

Cette voie est également activée lors de la réponse immunitaire immédiate (non spécifique) par l'interaction du C1 à divers composants de microorganismes (bactéries, virus) selon deux mécanismes nécessitant l'implication des protéines de l'inflammation de phase aiguë. Il est sous l'action de cytokines (synthétisées par les macrophages) : IL1, IL6 et TNF α . D'autres protéines vont être synthétisées par le foie (protéines de l'inflammation de phase aiguë).

- La CRP (sert à diagnostiquer un état inflammatoire) va se lier à des résidus de phosphorylcholine de la paroi des microorganismes. Quand elle est liée, elle active le C1 (elle a une activité enzymatique).
- La MBP (ou MBL) a une structure proche de la sous unité C1q, constitutive du facteur C1. Associée à cette structure, on trouve une sérine-protéase. En se liant aux résidus mannose de la surface des microorganismes, l'activité sérine-protéase est démasquée et l'activité enzymatique libérée est proche de l'activité de C1. IL y aura donc une activation du facteur C4. La liaison au mannose provoque une activité

opsonisante directe car il y a interaction avec un récepteur au mannose des cellules phagocytaires.

Cette cascade aboutit, dans un premier, à la génération d'une activité sérine-protéase (la même que l'activité du C1). Dans un deuxième temps, on observe une activité C3/C5 convertase.

→ C'est un système bis C1.

C'est la voie nommée « troisième voie » ou « voie des lectines ».

1\ L'activité C1 - Sérine-protéase.

L'activation se fait sur la surface antigénique.

Insérer document page 1 en haut.

Le C1 est un complexe moléculaire composé de trois types de molécules Ca-dépendantes (sous unités réunies par le calcium).

C1q (interagit avec l'antigène via l'Ig), 2 fois C1r et 2 fois C1s. C1r et C1s sont des proenzymes. Le poids moléculaire du complexe est environ de 750.000Da.

C1q est une molécule composée de 18 chaînes polypeptidiques réunies 3 par 3. Cet ensemble a une conformation spatiale rappelant celle d'un « bouquet de 6 tulipes ». Chaque « fleur » comprend 3 chaînes polypeptidiques. Dans la partie C-terminale, on observe une conformation globulaire. LA région centrale et la région N-terminale sont en triple hélice (liaisons par des ponts di-sulfures).

Dans la région centrale viennent se disposer deux molécules de C1r et de C1s. L'interaction des régions C-terminales de C1q à au moins deux molécules d'IgG ou à une IgM (pentamérique, avec domaine CH3) entraîne une modification conformationnelle du C1 qui est responsable d'une auto-activation des deux sous-unités C1r. Ces deux sous-unités vont alors démasquer leur site actif de sérine-protéase. Cette activité clive (protéolyse) les sous-unités C1s et génère alors une nouvelle activité enzymatique sérine-protéase, capable de cliver une gamme de protéines : il va y avoir clivage des facteurs C4 et C2 de ce système et génération d'une activité C3 et C5 convertase.

2\ L'activité C3 et C5 convertase.

Ces enzymes ont pour substrat le C3 et le C5.

Sur le complexe C1-Ig vient se fixer le C4. Ce dernier est une glycoprotéine de 3 chaînes polypeptidiques (α , β et γ) reliées par des ponts di-sulfures.

Le C1s va cliver la chaîne α du C4 (la grande chaîne) et libérer un petit peptide (le C4a, une anaphylatoxine) et un petit peptide, le C4b qui se fixe sur la surface activatrice (antigénique) par liaison covalente.

La chaîne α a une liaison thioester interne qui s'établit entre le groupement carbonyle de l'acide glutamique et le groupement SH d'une cystéine.

Le clivage de la chaîne α va entraîner la coupure de ce pont et le groupement C=O va aller agir avec les groupements aminés des protéines antigéniques ou bien avec les groupements hydroxyles de glycoprotéines et de glucides.

Une grande partie du C4b réagit avec les molécules d'eau environnantes : il y a de cette manière formation d'un composé inactif, le C4bi.

La fixation sur l'antigène libère le site de fixation de C2 qui agit avec du Mg. Il se forme ainsi, à proximité de C1, les complexes C4bC2. Au niveau de ces complexes, le C2 est clivé par

l'action de l'activité sérine-protéase du C1s. Il y a libération d'un petit fragment, le C2b, et d'un grand fragment (le C2a).

Au niveau de C2a, il y a un nouveau site enzymatique qui est démasqué (site sérine-protéase) quand il se fixe au C4b.

Les complexes C4bC2a, à proximité du C1, correspondent à la C3 convertase classique : c'est un complexe qui va catalyser le clivage du C3 et aboutir à la génération d'une activité C5 convertase et à un dépôt sur la surface antigénique d'un grand nombre de molécules de C3b.

Le C3 est le facteur plasmatique le plus abondant et celui dont l'effet biologique est le plus important (par sa qualité d'opsonisant). Ce facteur est formé de deux chaînes polypeptidiques. C4bC2a fixe une molécule de C3 et clive la chaîne α , libérant ainsi le C3a (petit fragment) soluble (et anaphylactique) et le C3b (le grand fragment) qui établit une liaison à la surface antigénique (même chose que pour le C4).

Cette fixation prévient d'une dissémination dans l'organisme du C3b (qui est opsonisant). C3b peut être inactivé, comme le C4, avec des molécules d'eau et formant alors le C3bi.

La C3 convertase est très active et génère jusqu'à 200 molécules de C3b fixées sur la paroi antigénique. Certaines de ces molécules restent fixées au complexe C4bC2a et donnent C4bC2aC3b aussi appelé C5 convertase.

Par activité de la sérine protéase de C2a, d'autres molécules de C3b vont activer la voie dite « alterne » du complément, résultant en une auto-amplification considérable de la formation du C3b.

Le complexe C4bC2aC3b va cliver le C5 et participer ainsi à la première étape de formation du CAM (complexe d'attaque membranaire) qui est commun aux deux voies d'activation.

C\ La voie alterne d'activation.

Cette voie est activée en absence du complexe Antigène/Anticorps. Elle constitue un événement déterminant (central) de la réponse immunitaire non spécifique (et immédiate). En parallèle, on aura déclenchement de la réaction inflammatoire et accroissement de la phagocytose.

1\ Activation basale du C3 en solution.

Cette voie est initiée par la fixation du C3b sur toute une variété de surfaces antigéniques (bactéries, virus, champignons) ou par la présence de complexe Antigène/IgA.

La présence du C3b est liée à une activation permanente basale du facteur C3 quand il est présent dans le plasma.

En solution aqueuse, C3 présente une faible hydrolyse de sa liaison thioester, donnant un composé (C3-H₂O), instable mais capable de lier (fixer) un facteur soluble de la voie alterne, B.

Au niveau de ces complexes, le facteur B (homologue structural et fonctionnel de C2) est clivé sous l'action d'une enzyme plasmatique (enzyme D). B est clivé en Ba et Bb restant lié au C3-H₂O. Bb présente une activité sérine-protéase (comme C2a).

→ Il va y avoir formation de C3 convertase soluble (très instable) qui peut fixer du C3 et cliver cette molécule en C3b et C3a.

2\ Apparition de l'activité C3 et C5 convertase alterne (Anticorps / Antigène).

En présence d'éléments étrangers, C3b se fixe sur l'antigène par l'intermédiaire d'un groupement carboxyle et fixe alors une molécule de B (formation de C3bN*). Il y a ensuite action de D qui libère Ba (soluble) et Bb qui présente une activité sérine-protéase (C3bBb*).

Ces complexes vont lier un autre facteur (le facteur P ou Properdine) qui rallonge la $\frac{1}{2}$ vie de ces complexes (passe de 5 minutes à 30 minutes) dont le substrat sera le C3 (c'est une boucle d'amplification).

→ C3 est à la fois produit et activateur.

Ceci permet d'avoir un dépôt d'un grand nombre de molécules de C3b sur les antigènes.

Certaines molécules de C3b restent fixées en complexes trimoléculaires ou tétramoléculaires, correspondant à la C5 convertase alterne.

→ C'est la 1^{ère} étape du CAM (complexe d'attaque membranaire).

D\ Formation du CAM.

Sous l'action de la C5 convertase classique ou alterne, vient se fixer une molécule de C5 (deux chaînes) qui subit un clivage par l'action de C2a (ou Bb) sérine-protéase. Il y a alors libération de C5a (anaphylatoxine) et de C5b restant lié au complexe et ayant un site de fixation spécifique (mais relativement labile) pour le C6.

A partir de là, on n'aura plus de clivage enzymatique.

Le complexe C5bC6 (lié au C3b) fixe une molécule de C7 et forme le complexe C5bC6C7 qui est amphiphile. Ce complexe va ainsi pouvoir s'insérer dans les membranes.

C5bC6C7 va fixer une molécule de C8 qui interagit avec le C9 ; ce qui déclenche la polymérisation de plusieurs molécules de C9 dans la membrane de l'antigène (on retrouve de 11 à 16 molécules de C9 agrégées). Ainsi, il se forme (grâce au C9) des pores d'environ 10 nanomètres de diamètre qui sont responsables de la lyse des cellules (et donc de la mort des cellules).

E\ Mécanismes de contrôle (régulation) des voies d'activation.

Les facteurs activés sont fixés sur la surface antigénique par des liaisons covalentes (C4b et C3b). Toutefois, l'activation en solution de certains facteurs (dont le C3) pourrait aboutir à un dépôt sur nos propres cellules et les détruire. En fait, nos propres cellules sont protégées par la présence d'inhibiteurs physiologiques qui vont limiter les effets des facteurs activés aux surfaces du non-soi (antigénique), tout comme de nombreux facteurs qui limitent le processus de la coagulation sanguine aux surfaces endothéliales lésées.

Les effets biologiques de l'activation du complément sur les particules antigéniques n'apparaissent que lorsque la concentration en facteurs activés atteint localement un niveau suffisant pour déborder l'action des inhibiteurs physiologiques (même principe que pour la coagulation sanguine).

1\ Contrôle de l'activation des voies classiques et alternes.

Plusieurs inhibiteurs physiologiques, soit solubles, soit membranaires, s'opposent à ces deux voies où inhibent l'activité des convertases.

a\ C1 inhibiteur (soluble).

Voir figure 9

Cette molécule fixe la sous-unité C1q et donc, provoque une dissociation des 23 sous-unités et bloque l'apparition de l'activité du C1s.

Le C1 inhibiteur fait parti de la famille de SERP IN qui est un inhibiteur des sérines-protéases. → Il y a action contre la voie classique.

b\ Inhibition des C3 et C5 convertases (classique/alterne).

- C4-BP (soluble)
Cette molécule est une protéine liant le C4.
- DAF.
C'est l'équivalent membranaire du C4-BP.

Ces deux facteurs ont une affinité pour le C4 et dissocient les complexes C4bC2a (inhibent l'activité C3 convertase).

DAF est sur les cellules sanguines, endothéliales, épithéliales. Ce sont des compétiteurs du C2a pour le C4b.

La liaison du C4b au C4-BP forme un complexe devenant sensible à la protéolyse par une enzyme plasmatique (l'enzyme I) qui est constitutivement active. Le complexe formé est C4BPC4b. Il y aura ensuite clivage du C4b en petits fragments inactifs : C4c + C4d.

Un mécanisme analogue intervient pour inhiber le C3b au sein des complexes convertasiques. Sur les cellules, il existe une molécule (CR1 : récepteur du complément) qui lie le C3b en le dissociant des complexes convertasiques : le CR1C3b est sensible aussi à l'enzyme I qui clive le C3b en fragments inactifs (C3c et C3dg)

Comme pour le C4b, il existe un inhibiteur soluble : le facteur H qui est plasmatique. Le complexe formé est C3bH qui est également sensible à I.

2\ Contrôle de l'activation du CAM.

Cf. figure 11.

Le principal facteur est plasmatique : facteur S ou vitronectine. Il va se lier au C7 dans les complexes C5bC6C7 et donner des complexes hydrophiles solubles incapables de s'insérer dans la membrane.

Le contrôle se fait aussi par des facteurs membranaires : par la Protectine (ou CD59). Cette molécule est fortement exprimée sur la membrane de nos cellules. Elle lie le C8 dans des complexes, ce qui empêche la polymérisation et l'insertion dans les membranes.

Insérer figure 9.

HRF (ou Facteur de Restriction Homologue) a la même activité que CD59 mais est membranaire.

Certains individus ont une absence congénitale de certains facteurs inhibiteurs comme le CD59 et le DAF. Ils vont développer une pathologie caractéristique : l'hémoglobinurie. Celle-ci va atteindre des paroxysmes nocturnes.

L'absence de ces deux facteurs et l'activation nocturne du complément par une diminution du pH durant la nuit entraîne une lyse de globules rouges.

II\ Les activités biologiques du complément.

A\ La lyse des agents pathogènes.

La destruction des agents pathogènes se fait par formation du PolyC9 au CAM. L'insertion du polyC9 va permettre la mise en place de larges pores déstabilisant les membranes. Les cellules atteintes par cette attaque vont perdre leur homéostasie (sortie de K⁺, entrée de Na⁺, d'eau) mais aussi par la pénétration d'enzymes (comme dans les lysosomes) qui sont responsables de la destruction des pathogènes.

Cette activité lytique est spectaculaire quand elle concerne la lyse des globules rouges mais le complément ne reste pas moins qu'un élément mineur dans le système de défense et, ainsi, les individus ayant une déficience congénitale en C9, ne montrent pas de sensibilité plus grande aux infections, quelles qu'elles soient.

Ceci n'est pas le cas pour les deux autres effets du complément : l'opsonisation et l'inflammation.

B\ L'opsonisation.

L'opsonisation est l'effet central, capital, de ce système. C'est le processus qui facilite la capture et la dégradation des antigènes par les cellules phagocytaires. Ce processus résulte de la reconnaissance spécifique de divers facteurs du complément par des récepteurs dits « CR » présents sur les cellules phagocytaires.

L'opsonisation est une fonction majeure du C3b qui est fixé en grand nombre sur une particule antigénique. Le C4b est aussi opsonisant mais avec un plus petit effet (car il est moins présent).

Sur ces cellules, quatre récepteurs (CR) ont été caractérisés (de CR1 à CR4).

1\ Le CR1 (ou CD35).

Le CR1 est le récepteur au C3b et au C4b (les facteurs fixés). Il est exprimé sur presque toutes les cellules phagocytaires (monocytes sanguins, macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles) mais aussi sur les cellules non phagocytaires comme les globules rouges, les lymphocytes B et les cellules dendritiques folliculaires.

L'interaction CR1-C3b sur les cellules phagocytaires va renforcer l'immunodéfiance des phagocytes sur la cellule antigénique (et aussi la phagocytose). Cette activité opsonisante de C3b

est fondamentale au début de la réponse immunitaire en l'absence d'Ig directement opsonisante (IgG).

Cette classe d'Ig est fortement présente en réponse secondaire (les IgG). En réponse primaire, on trouvera plutôt des IgM qui ne sont pas directement opsonisante (pas de récepteur au fragment Fc des phagocytes). Les IgM sont indirectement actives par activation du complément.

Certains individus ont une déficience en C3 : ils vont avoir de graves infections pouvant être létales. On parle dans ce cas d'une réelle immunodéficience.

Sur les globules rouges, l'expression membranaire de CR1 permet la fixation et le transport des complexes Ag/Ac circulant, recouverts par C3b. Ce transport ira jusqu'à la rate ou bien au foie (action des macrophages spléniques ou celles de Kupffer).

La clearance est une fonction des complexes immuns qui prévient d'un dépôt de ces complexes dans les capillaires sanguins et particulièrement dans les capillaires des glomérules rénaux. S'il y avait des accumulations dans ces capillaires, cela pourrait provoquer de graves atteintes rénales.

Pour les lymphocytes B, le CR1, en se liant au C3b, transduit un signal intracellulaire d'activation de ces lymphocytes.

Pour les cellules folliculaires dendritiques (cellules au niveau d'amas lymphoïdes, notamment dans les ganglions lymphatiques), grâce à CR1, il n'y a quasiment pas de phagocytose : elles vont fixer les antigènes recouverts de C3b et ceci, pendant de longues périodes. Ceci permet de stimuler de manière prolongée les lymphocytes B (rôle dans la mémoire immunitaire).

2\ Le CR2 (ou CD21).

Le CR2 présente une expression restreinte aux lymphocytes B et aux cellules folliculaires dendritiques.

Ce récepteur interagit avec les fragments inactivés du C3 (C3bi, C3d et C3dg).

La fonction de cette molécule est une activation des lymphocytes B par un mécanisme qui est non connu. Le CR2 est le récepteur d'un virus à herpès (EBV : virus d'Epstein Barr) qui provoque la mononucléose infectieuse.

Dans ce cas, la multiplication des lymphocytes B est indépendante de celle des lymphocytes T auxiliaires.

3\ Le CR3 et le CR4.

Le CR3 appartient à la famille des intégrines (hétérodimères). Celui-ci est exprimé sur la membrane des monocytes, des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et sur les cellules NK. Le CR3 a comme ligand le C3bi. Ce CR3 a des propriétés de lectine (liaison à des résidus glucidiques de la paroi des microorganismes). Le CR3 interagit aussi avec le LPS (lipopolysaccharides) des bactéries.

Le CR4 est fortement exprimé sur les macrophages tissulaires : ce sont des récepteurs aux antigènes opsonisés par le C3bi.

4\ L'activité pro-inflammatoire.

Cette activité pro-inflammatoire relève de la libération des petits fragments qui vont se lier à des récepteurs cellulaires sur la membrane des cellules phagocytaires et sur des polynucléaires neutrophiles non phagocytaires (les basophiles sanguins) et sur les mastocytes (tissulaires).

On trouve également des récepteurs sur les plaquettes.

La fixation se fait par l'extrémité C-terminale (arginine). L'activité de ces trois fragments est sous le contrôle d'enzymes sériques (= du sérum) qui sont des carboxypeptidases, ce qui diminue ou annule l'activité biologique de ces trois facteurs.

Leur activité biologique est le déclenchement de la réaction inflammatoire dont les manifestations évoquent celles du choc anaphylactique (provoqué par des anaphylatoxines).

L'anaphylaxie a été découverte au début du 20^{ème} siècle : c'est une réaction inflammatoire extrême (hypersensibilité) dont le mode d'action sera détaillé dans un chapitre spécifique.

5\ Génétique et codage du complément.

A l'état basal, les facteurs du complément sont synthétisés par le foie. Lors d'une réponse immunitaire, ces facteurs sont aussi produits par des leucocytes comme les macrophages et les monocytes mais également par une catégorie cellulaire plus « originale », les fibroblastes.

Il existe un polymorphisme de structure de presque tous les facteurs du complément. Par exemple, pour C4, il existe 40 variants alléliques connus.

Un certain nombre de gènes du complément sont présents au niveau du CMH et sont appelés « la classe 3 ».

Il existe de nombreux déficits génétiques qui concernent pratiquement tous les facteurs du complément, ce qui provoque des immunodéficiences et des pathologies (notamment l'absence de clearance).